

"Maduración y funcionalidad de neuronas dopaminérgicas derivadas de células troncales neurales humanas de mesencéfalo ventral. Efectos de Bcl-X_L".

Memoria de tesis doctoral presentada por:
Emma M^a González Seiz.

Director de tesis: Dr. Alberto Martínez-Serrano.
Co-director de tesis: Dra. Milagros Ramos.

Centro de biología Molecular Severo Ochoa
Departamento de Biología Molecular
Facultad de Ciencias
Universidad Autónoma de Madrid
2010



Esta tesis doctoral está
dedicada a mi madre.

ÍNDICE

ÍNDICE

ÍNDICE.....	7
ÍNDICE DE FIGURAS y TABLAS.....	11
AGRADECIMIENTOS.....	17
ABSTRACT	21
ABREVIATURAS	25
INTRODUCCIÓN	31
1. Terapia celular en la enfermedad de Parkinson.	31
2. Las neuronas dopaminérgicas del grupo A9.	36
3. Desarrollo del cerebro medio y control genético de la aparición de las neuronas dopaminérgicas del grupo A9.	40
4. Trasplante de neuronas dopaminérgicas en modelos hemiparkinsonianos de rata. Seguimiento de su evolución mediante técnicas de imagen.	43
5. Bcl-X _L	47
I. La familia de Bcl-2	47
II. Papel de Bcl-X _L	47
6. Resultados previos.	49
ANEXO I	53
OBJETIVOS	61
MATERIALES Y MÉTODOS	65
1. Cultivos celulares.....	65
I. Generación y Cultivo de células humanas de mesencéfalo ventral.....	65
II. Cultivos primarios de mesencéfalo ventral de ratón	66
2. Estudio de <i>microarrays</i> de ADN	67
I. Preparación de las muestras celulares y aislamiento del ARN	67
II. Síntesis del cARN biotinilado.....	68
III. Análisis de expresión génica: hibridación, lavado y escaneo de los <i>microarrays</i> ...	68
IV. Análisis de datos.....	68
3. Estudios de Q-RT-PCR.....	69
I. Extracción del RNA y síntesis de los cADN	69
II. PCR a tiempo real	70
III. Análisis de los resultados	70
4. Inmunocitoquímica.	71

5. Microscopía	72
6. <i>Western blots</i>	73
7. Ensayos de actividad del transportador de dopamina (DAT).....	74
I. “Re-uptake” de dopamina.....	74
II. Marcaje de células vivas con 4-Di-2-ASP.....	75
III. Tratamiento de los cultivos con 6-OHDA	75
8. Imagen de la endocitosis y exocitosis de las vesículas sinápticas.....	76
9. Análisis morfométrico	76
10. Estudios de IMAGEN DE calcio CITOSÓLICO.....	77
11. Electrofisiología	77
I. Cultivos organotípicos y co-cultivos	78
12. Marcaje de las células hVM1 high Bcl-X _L con nanopartículas de óxido de hierro superparamagnéticas	79
I. Experimentos “in vitro”	79
II. Determinación de la concentración de NNP y el tiempo de incubación	79
III. Ensayos de viabilidad celular.....	80
IV. Efecto de las NNP sobre la diferenciación celular.....	80
V. Ensayo de ciclo celular	81
VI. Pérdida del marcaje de las células con NNP con los pases en cultivo	81
VII. Experimentos “in vivo”: trasplante de células hVM1 high Bcl-X _L marcadas con NNP en roedores	82
a) Animales utilizados.....	82
b) Modelo hemiparkinsoniano	82
c) Test de comportamiento: medidas de rotación inducidas por drogas.....	83
d) Trasplante de células hVM1 high Bcl-XL con NNP en estriado de animales lesionados.....	84
e) Imagen de resonancia magnética (IRM).....	87
f) Análisis histológico del tejido (IHC)	87
g) Estudios de PET.	89
ANEXO II	91
RESULTADOS	97
1. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA, ESTUDIOS DE MADURACIÓN Y FUNCIONALIDAD EN LAS LÍNEAS hVM1 y hVM1 high Bcl-X _L	97
I. Regionalización mesencefálica de las células estudiadas.	97
II. Perfil fenotípico de las células derivadas de mesencéfalo ventral.	99

a) Genes relacionados con organización del tubo neural y presencia de progenitores neuronales.....	100
b) Genes implicados en la adquisición del fenotipo dopaminérgico.....	103
c) Genes responsables del fenotipo dopaminérgico.....	105
d) Genes relacionados con la maduración funcional de las neuronas dopaminérgicas.	106
e) Estudio de otros fenotipos neuronales de mesencéfalo ventral.	109
f) Estudio de los receptores para otros neurotransmisores diferentes de la dopamina.	110
III. Análisis morfométrico de los cultivos de hVM1 y hVM1 high Bcl-X _L diferenciados durante largo tiempo in “vitro”	113
IV. Estudios del transportador de dopamina DAT.....	118
a) Estudios <i>in vivo</i> con 4-Di-2-ASP.....	119
b) Tratamiento de los cultivos con 6-OHDA.....	121
c) Re-captura de dopamina.....	123
V. Imagen de la endocitosis y exocitosis de vesículas sinápticas.	124
VI. Estudios de imagen de calcio citosólico con Fura2.	126
3.1.....	126
3.2.....	126
3.3.....	126
3.4.....	126
3.5.....	126
a) Respuesta a despolarización por alto KCl.....	126
b) Respuesta a neurotransmisores relacionados con la funcionalidad de neuronas A9 de SNpc.....	127
c) Oscilaciones periódicas espontáneas de calcio en células hVM1 high Bcl-X _L	129
VII. Electrofisiología.	131
2. Marcaje “in vitro” de células troncales neurales con nanopartículas magnéticas para su detección y seguimiento mediante IRM.	137
I. Marcaje in vitro de las células hVM1 high Bcl-X _L : establecimiento de las condiciones óptimas de marcaje y propiedades de los cultivos marcados.	138
3.1.....	138
a) Establecimiento de las condiciones óptimas de marcaje.....	138
i) Tipo de NNP, tratamiento y tiempo de incubación.....	138
ii) Viabilidad celular.	141
b) Validación de los cultivos hVM1 high Bcl-X _L marcados con NNP.	142
i) Efectos de las NNP en el ciclo celular de hNSCs de mesencéfalo ventral.	143
ii) Efecto de las NNP en el proceso de diferenciación de hNSCs.....	144
II. Internalización de las NNP.	145

III.	Persistencia del marcaje con NNP de las células hVM1 high Bcl-X _L con los pases.	147
IV.	Detección mediante IRM de las NNP en el cerebro de roedor.	148
V.	Estudio longitudinal (en el tiempo) mediante IRM del trasplante de células marcadas con NNP.	150
a)	Estudios a corto, medio y largo plazo de los trasplantes marcados con NNP. Análisis mediante histología, IRM y PET.	152
i)	Estudios a corto plazo.	152
ii)	Estudios a medio plazo.	152
iii)	Estudios a largo plazo.	154
	IRM	154
	PET	156
3.	Efectos de la sobre-expresión de Bcl-X _L en células humanas derivadas de mesencéfalo ventral: análisis de microarrays de ADN.	158
I.	Diseño del estudio.	158
II.	Determinación de los parámetros estadísticos del análisis	159
III.	Cambios en genes con función conocida en el desarrollo y generación de neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo ventral.	162
IV.	Selección de genes candidatos a jugar un papel importante en la generación de neuronas dopaminérgicas desde hNSC de mesencéfalo ventral.	163
V.	Validación de los resultados del <i>microarray</i>	166
	DISCUSIÓN	171
1.	Propagación correcta de los precursores mesencefálicos.	171
2.	Control genético del desarrollo de las neuronas dopaminérgicas. Efecto de Bcl-X _L	173
3.	Funcionalidad.	178
4.	Marcaje de células troncales neurales con nanopartículas magnéticas.	182
5.	Nuevas acciones de Bcl-X _L	185
	CONCLUSIONES	189
	REFERENCIAS	195
	MATERIAL SUPLEMENTARIO	208

ÍNDICE DE FIGURAS y TABLAS

INTRODUCCIÓN

Fig. 1. Diferentes fuentes de células utilizadas en la actualidad para la obtención de neuronas dopaminérgicas.....	33
Fig. 2. Localización y proyecciones axonales de los diferentes grupos de neuronas dopaminérgicas, en una vista sagital del cerebro del ratón adulto.	36
Fig. 3. Distribución esquemática de la expresión de proteínas de unión a calcio (calbindina, calretinina y parvalbúmina) en la región del cerebro medio humano.....	37
Fig. 4. A) Conexiones principales del circuito motor de los ganglios basales. B) Dibujo esquemático mostrando las interacciones mediadas por neurotransmisores en las que está implicada una neurona dopaminérgica.	38
Fig. 5. Propiedades electrofisiológicas de las neuronas dopaminérgicas de la Sustancia Negra pars compacta.....	39
Fig. 6. Desarrollo en cuatro dimensiones de las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas. Primera dimensión: posicionamiento antero/posterior (A/P). Segunda y tercera dimensión: posicionamiento dorsoventral (D/V) y medio lateral.	41
Fig. 7. Desarrollo en cuatro dimensiones de las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas. La cuarta dimensión: el momento del desarrollo.....	42
Tabla 1. Resultado de los trasplantes realizados a partir de distintas fuentes alternativas de neuronas dopaminérgicas en modelos hemiparkinsonianos de roedor.....	44
Fig. 8. Visualización de hNSC marcadas con SPIO mediante tinción de azul de Prusia. Seguimiento longitudinal de trasplantes de hNSC+SPIO en el cerebro de roedor mediante IRM. Imágenes de PET con ¹¹ C-DTBZ en modelos de lesión con 6-OHDA en rata.	45

ANEXO 1: resultados previos.

Fig. 1. Propiedades fenotípicas de la línea hVM1 en división (en presencia de bFGF y EGF en el medio de cultivo) y después de 7 días de diferenciación en medio sin mitógenos suplementado con dbAMPc y GDNF.	53
Fig. 2. Análisis mediante inmunocitoquímica de las células β -III-Tubulina (rojo) y TH (verde) generadas a partir de cultivos de células hVM1 en división y en diferenciación (3 y 7d) en medio Lotharius.	53
Fig. 3. Estudio de las neuronas TH ⁺	54
Fig. 4. Análisis fenotípico de las neuronas TH ⁻	54
Fig. 5. Efecto de la expansión prolongada in vitro de las células hVM1 sobre su capacidad neurogénica.	55
Fig. 6. Esquema mostrando el procedimiento experimental realizado para la sobre-expresión de Bcl-X _L en la línea celular hVM1 a pase bajo.	55
Fig. 7. La línea celular hVM1 high Bcl-X _L mantiene la pluripotencialidad observada en hVM1.	56
Fig. 8. Estudio de las neuronas TH ⁺ generadas en la línea celular hVM1 high Bcl-X _L	56

RESULTADOS

Fig. 1. Análisis de la expresión relativa de genes implicados en regionalización del sistema nervioso central y diferenciación dopaminérgica de las células hNS1 y hVM1.....	98
Fig. 2. Estudios de expresión de las proteínas de unión a calcio (calbindina, calretinina y parvalbúmina) en las líneas celulares hVM1 y hVM1 high Bcl-X _L	99

Fig. 3. Estudio de expresión de genes relacionados con la organización y especificación del tubo neural y la presencia de progenitores neuronales en las células hVM1 y hVM1 high Bcl-X _L	101
Fig. 4. Estudio de expresión de los factores de transcripción relacionados con la adquisición el fenotipo dopaminérgico en células hVM1 y hVM1 high Bcl-X _L en división y diferenciadas 4 y 7d.	104
Fig. 5. Estudio de expresión de las enzimas responsables de la adquisición el fenotipo dopaminérgico en células hVM1 y hVM1 high Bcl-X _L en división y diferenciadas 7d.	105
Tabla 1. Porcentaje de células TH positivas frente al número total de células presentes en cultivos de las dos líneas celulares tras 7, 12 y 30d de diferenciación.....	106
Fig. 6. Estudio de expresión de genes relacionados con la maduración funcional de las neuronas dopaminérgicas en células hVM1 y hVM1 high Bcl-X _L en división y diferenciadas hasta 30d.	107
Fig. 7. Porcentaje de neuronas generado en los cultivos de células hVM1 y hVM1 high Bcl-X _L a 12, 20 y 30d de diferenciación.....	109
Fig. 8. Otros fenotipos neuronales presentes en las células hVM1 y hVM1 high Bcl-X _L diferenciados durante 30d.....	110
Tabla 2. Porcentaje de células positivas para otros neurotransmisores diferentes de la dopamina frente al número total de células presentes en cultivos de las dos líneas celulares tras 30d de diferenciación.....	110
Fig. 9. Estudio de la expresión de otros receptores de neurotransmisores diferentes a la dopamina en células hVM1 y hVM1 high Bcl-X _L en división y diferenciadas 12 y 30d.	112
Fig. 10. Medida del área del cuerpo celular de las células TH ⁺ obtenidas en cultivos primarios de ratón (E12) de mesencéfalo ventral (C1º, 22d en cultivo) y de células hVM1 y hVM1 high Bcl-X _L diferenciadas durante 30d.	114
Fig. 11. Patrón de arborización de las células TH ⁺ obtenidas a partir de cultivos primarios de ratón (E12) de mesencéfalo ventral (C1º, 22d en cultivo) y de células hVM1 y hVM1 high Bcl-X _L diferenciadas durante 30d.	115
Fig. 12. Número y longitud media de cada tipo de neurita según el día de diferenciación.	116
Fig. 13. Longitud total del árbol de neuritas de una célula TH ⁺	118
Fig. 14. Estudios <i>in vivo</i> del transportador de dopamina DAT mediante el sustrato ASP+.	119
Fig. 15. Estudios indirectos <i>in vitro</i> de la actividad de DAT en cultivos de células hVM1 y hVM1 high Bcl-X _L diferenciadas durante 30d.	122
Fig. 16. Estudio de la actividad de DAT mediante la medida de la re-captura de dopamina en cultivos primarios de ratón y de células hVM1 y hVM1 high Bcl-X _L diferenciadas durante 30d.....	123
Fig. 17. Imagen de endocitosis y exocitosis de vesículas sinápticas mediante FM4 64.	124
Fig. 18. Estudios de imagen de calcio con Fura2: despolarización por alto KCl.	127
Fig. 19. Estudios de imagen de calcio con Fura2: respuesta a neurotransmisores.	128
Tabla 3. Porcentaje de células que responden incrementando su (Ca ²⁺) _i tras la aplicación de KCl, dopamina, glutamato o GABA en ambas líneas celulares diferenciadas 7d.....	129
Fig. 20. Estudios de imagen de calcio con Fura2: oscilaciones periódicas espontáneas de calcio en las células hVM1 high Bcl-X _L	130
Fig. 21. Expresión de proteínas de canales de Ca ²⁺ , Na ²⁺ y K ⁺ dependientes de voltaje en las células hVM1 y hVM1 high Bcl-X _L diferenciadas 30d.	132
Fig. 22. Diferentes propiedades de membrana observadas en las células analizadas mediante <i>whole cell patch-clamp</i>	133
Fig. 23. Propiedades electrofisiológicas de los cultivos diferenciados de la línea hVM1.....	134
Fig. 24. Propiedades electrofisiológicas de los cultivos diferenciados de la línea hVM1 high Bcl-X _L ...	135

Fig. 25. Incubación de los cultivos de células hVM1 high Bcl-X _L con diferentes tipos de NNP, tratamientos y tiempos de incubación.	139
Fig. 26. Porcentaje de células hVM1 high Bcl-X _L que incorporan NNP en su interior tras su incubación bajo diferentes condiciones.	404
Fig. 27. Tratamiento de los cultivos de células hVM1 high Bcl-X _L con distintos tipos de NNP a distintas concentraciones.	142
Fig. 28. El análisis de ciclo celular por citometría de flujo de las células hVM1 high Bcl-X _L tras 24 y 48h en proliferación de cultivos sin tratar e incubados con NNP-100-Dx a 50µgFe/ml.	144
Fig. 29. Diferenciación de los cultivos marcados con NNP.	145
Fig. 30. Imágenes de microscopía confocal mostrando las NNP en el interior de las células hVM1 high Bcl-X _L	146
Fig. 31. Localización citoplasmática de las NNP internalizadas.	147
Fig. 32. Pérdida del marcaje con NNP tras varios pases en cultivo.	148
Fig. 33. Detección en el cerebro de roedor de distintos tipos de NNP mediante IRM.	149
Fig. 34. Estudio longitudinal del trasplante de células hVM1 high Bcl-X _L +NNP en el cerebro de rata mediante IRM.	151
Fig. 35. Seguimiento mediante IRM e IHC de los trasplantes de células hVM1 high Bcl-X _L +NNP en el cerebro de rata a corto y medio plazo.	153
Fig. 36. Seguimiento mediante IRM e IHC de los trasplantes de células hVM1 high Bcl-X _L +NNP en el cerebro de rata a largo plazo (5 meses post-trasplante).	155
Fig. 37. Estudio de la funcionalidad de VMAT2 en los trasplantes de células hVM1 high Bcl-X _L +NNP en el cerebro de rata a largo plazo (5 meses post-trasplante) mediante PET.	156
Fig. 38. Análisis de correlación entre muestras.	159
Fig. 39. Selección de umbrales para los parámetros de análisis del <i>microarray</i>	160
Fig. 40. Representación esquemática de los genes que cambian en el <i>microarray</i> para cada comparación de muestras.	161
Tabla 4. Resumen de la distribución de genes inducidos y reprimidos tras el primer análisis de los resultados del <i>microarray</i> de ADN.	161
Tabla 5. Índice de cambio de los genes relacionados con el fenotipo dopaminérgico mesencefálico según los parámetros de <i>fod change</i> y FDR elegidos.	162
Tabla 6. Procesos biológicos afectados mayoritariamente en cada comparación celular.	164
Tabla 7. Distribución de los genes según su patrón de expresión teniendo en cuenta el log.norm de las intensidades del <i>microarray</i>	165
Fig. 41. Validación de los genes seleccionados como de interés tras un análisis exhaustivo de los <i>microarrays</i> de ADN mediante Q-RT-PCR.	167
Tabla 8. Validación de los genes seleccionados como de interés tras un análisis exhaustivo de los <i>microarrays</i> de ADN mediante Q-RT-PCR.	168

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar querría dar las gracias a Alberto Martínez Serrano, por darme la oportunidad de realizar mi tesis doctoral en su grupo y comenzar así mi carrera científica. También quiero agradecer a Milagros Ramos su apoyo, muy importante para continuar adelante en los momentos difíciles.

Fuera del laboratorio quisiera agradecer en especial el apoyo y la comprensión que he recibido en estos años de Alejandro. Eres una de las personas con mejor corazón que conozco. Tu gran curiosidad y tu mente siempre activa hubiesen hecho de ti un científico brillante. También debo agradecer a mi madre, abuelos, tí@s y familia política el ser como son y estar siempre cerca en los buenos y malos momentos.

Todavía recuerdo con cariño aquel laboratorio 450 del módulo CX de la facultad de ciencias donde empezó esta andadura. En aquel reducido espacio convivíamos acogidos por la Dra. Jorgina Satrústegui, y pasé a formar parte de una gran familia. Gracias a Inma, Laura, Carlos B, Santi, Bea N, Bea P, Bea M, Julia, Bárbara, Isabel M, Araceli, Isabel L, Elena, Jose, Javi, Patri, ElisE, ElisA, Irene, Nacho, Alai por hacer que aquel comienzo fuese menos duro debido a los buenos ratos que pasamos juntos.

Tras unos años, llegó la tan deseada entrega del nuevo CBM-SO y la mudanza....Después de esto, el 450 se dividió y pasamos a formar parte de dos laboratorios el 305 y el 321, que aunque en extremos opuestos del edificio, siempre estarán unidos.

Con el tiempo, algunas personas se fueron, pero llegaron otras. Gracias a Carlos R, Kathi, Miguel, César, Tamara, Carla, Joana, Tania, Igancio y Maria José por esa bocanada de aire fresco que siempre viene bien.

Quiero dar las gracias especialmente al Dr.Merab Kokaia por acogerme en su laboratorio y hacer que me sintiese como en casa estando tan lejos. Gracias Jan, fue un placer trabajar contigo y tu carácter nada danés hizo menos arduas las horas de electrofisiología. Durante esos 3 meses formé parte de otra gran familia. Gracias a Ana, Danisa, Irene, Marcos, Mario y James, espero veros en futuros congresos ;).

De vuelta al CBM, debo dar las gracias al esfuerzo técnico de Ignacio y Marta, sin cuya ayuda gran parte de estos resultados no habrían sido posibles. Especialmente a ti Marta, cuyo trabajo con los animales jamás podría ser justamente recompensado.

No puedo olvidarme de todo el personal del centro, microscopía, citómetro y animalario en especial, que han hecho posible la realización de este trabajo. Así como la unidad de genómica

del Parque Científico, el CAI de la UCM y el CIMES de Málaga, con profesionales así da gusto trabajar.

Tampoco me olvido de vosotros, Yago, Jimena y Nuria, cuya presencia en el laboratorio siempre ha sido positiva y acompañada de momentos de alegría. Siempre recordaré esos bailes durante el mundial.

Tengo que dar las gracias a todos por esos momentos tan buenos en el comedor y en la cafetería. Especialmente los pasados con Patri y Tamara y recientemente con Tania y Maria José, sois algo más que compañeras de laboratorio.

Pero bueno, fuera del CBM también hay vida y esta sería muy aburrida sin mis amigas. Marta, Mary, Virginia, Patri, Ceci, Alicia y Ángela, os llevo en el corazón y doy gracias por contar con amigas así.

No me puedo olvidar tampoco de Mamen, Nuria, Rafa, Fran y Carlitos. Más que amigos sois como una segunda familia. Mamen, gracias por entender tantas cosas que para otros son tan difíciles. Espero que podáis venir a la tesis y que no os durmáis.

ABSTRACT

ABSTRACT

Parkinson's disease is one of the major neurodegenerative disorders characterized by a progressive degeneration and loss of nigrostriatal dopaminergic neurons. Experimental therapies based on cell replacement of the lost *Substantia Nigra pars compacta* dopaminergic neurons using human ventral mesencephalic fetal tissue, provided the proof of principle that replacement therapies had a therapeutic effect on Parkinson's disease patients. However, ethical and logistic problems related to fetal tissue procurement, made necessary to found an alternative source of dopaminergic neurons which could be used routinely in cell replacement therapies.

Our group generated a new stable cell line of human neural stem cells derived from ventral mesencephalon (hVM1) using v-myc immortalization. hVM1 cells expressed neural stem cell and radial glial markers under proliferation conditions, and after withdrawal of growth factors, differentiated into astrocytes, oligodendrocytes and neurons. The hVM1 cells yield a large number of dopaminergic neurons (12%), but lose their neurogenic ability after long time of *in vitro* expansion. The over-expression of Bcl-X_L in hVM1 cell line solves this problem and increases the number of dopaminergic neuron generated up to 18%.

In the present work, both cell lines (hVM1 and hVM1 over-expressing Bcl-X_L) were characterized in detail, to understand the expression of genes and proteins involved in neurogenesis, development of neurons and specifically dopaminergic neurons, maturation and functionality of the long term differentiated cultures. Both cell lines express the proper genes related with acquisition of a dopaminergic A9 phenotype. Interestingly, Bcl-X_L over-expressing cultures showed an increase in the number of neuronal progenitors and generated a higher percentage of dopaminergic neurons, which arise earlier during differentiation, and present higher levels of proteins related with maturation and functionality. Moreover, we report here that cells differentiated from hVM1 and hVM1 high Bcl-X_L cultures express electrophysiological properties of functional neurons and are able to respond to neurotransmitters *in vitro*.

Finally, we investigated if hVM1 high Bcl-X_L cells could be labelled *in vitro* with SPIOs (superparamagnetic iron oxide nanoparticles) without changing their phenotypical properties. The hVM1 high Bcl-X_L SPIO labelled cells could be easily detected by RMI after transplantation in the striatum of hemiparkinsonian rats. Now, we started the studies needed to co-localize RMI with PET images, and develop the protocols to study in parallel the anatomical and functional properties of the transplanted cells in a non-invasive manner.

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

5'-HT: 5' hydroxytryptamine
 6-OHDA: 6-hidroxidopamina
 Acho: acetilcolina
 ADH2: Aldehído Deshidrogenasa 2
 AMPT: alfa-methyl para-tirosina
 ARNm: Ácido ribonucleico mensajero
 ASP+: 4-(-(dietilamino)estiril)-N-metilpirimidina de yodo
 Bak: BCL2-antagonist/killer 1
 Bax: Bcl2-associated X protein
 Bcl2: B-cell leukemia/lymphoma 2
 Bcl-X_L: Bcl2-like 1
 BDNF: Brain Derived Neurotrophic Factor
 bFGF: basic Fibroblast Growth Factor
 Cdk1/2: Cyclin dependent kinase 1/2
 Citc: Citocromo C
 DA: Dopamina
 DAT: Dopamine Transporter
 dbAMPc: dibutyl-cyclic Adenosine Monophosphate
 DCX: doblecortina
 DX: dextrano
 CHR3: receptor de acetilcolina ionotrópico
 CHR5: receptor de acetilcolina metabotrópico
 DMSO: Dimethylsulfoxide
 DRD2: receptor de dopamina tipo 2
 E10,5: día embrionario 10,5
 EGF: Epidermal Growth Factor
 En1/2: Engrailed 1/2
 ESC: embryonic Stem cells
 ESM: error estándar para la media
 FACS: Fluorescence Activated Cell Sorting
 FGF8: Fibroblast Growth Factor 8
 Foxa2/HNF3 β : forkhead box A2
 FSC-H: Forward Scattered
 GABA: g-Aminobutyric Acid
 GABA-A-R3: receptor de GABA tipoA alfa 3

ABREVIATURAS

GABA-B-R1: receptor de GABA tipo B alfa 1
Gbx2: gastrulation brain homeobox 2
GDNF: Glial Derived Neurotrophic Factor
GFAP: Glial Fibrillary Acid Protein
GIRK2: G-protein-coupled inwardly rectifying potassium channel 2
Glu: glutamato
GluR: receptor de glutamato
GTPCH: GTP ciclohidrolasa
HB15: células hVM1 high Bcl-X_L a pase 15
HB35: células hVM1 high Bcl-X_L a pase 35
hNSC: células humanas neurales troncales (human Neural stem cells)
HSC: human stem cell medium
hVM: human Ventral Mesencephalon
hVM10: células hVM1 a pase 10
hVM35: células hVM1 a pase 35
ICC: Inmunocitoquímica
IHC: Inmunohistoquímica
IP: yoduro de propidio
iPS: células pluripotentes inducidas
IRM: imagen de resonancia magnética
JNK: c-Jun terminal Kinase
L-DOPA: Levo-DOPA
Lmx1a/b: LIM homeobox transcription factor 1 a/b
LTR: Long Terminal repeat (promotor del virus de leucemia murina)
MASH1: mouse achaete Scute complex homolog 1
MAP2: Microtubule-Associated Protein 2
MBP: Myelin Basic Protein
MPTP: 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine
MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazol
MSX1: msh homeobox 1
MV: Mesencéfalo Ventral
nDA: neurona dopaminérgica
NET: transportador de norepinefrina
Ng2: proteoglican condroitin sulphate
NGF: Nerve Growth Factor
Ngn2: neurogenina 2
Nkx2-2: NK2 homeobox 2
NMDA: N-Methyl-d-Aspartate

NMDAR2A: receptor de glutamato ionotrópico
 NMF: nomifensina
 NNP: nanopartículas superparamagnéticas de hierro
 NSC: Neural stem cells
 NURR1: nuclear receptor-related 1, member of the steroid-thyroid hormone-retinoid receptor superfamily
 OCT3/4: POU class 5 homeobox 1
 OTX2: orthodenticle homolog 2
 p27KIP1: Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B
 PET: tomografía de emisión de positrones
 PITX3: paired-like homeodomain transcription factor 3
 PLL: L-polilisina
 PTM: protamina
 Rh-GFP: humanized renilla Green Fluorescent Protein
 SEM: error estándar de la media
 SERT: transportador de serotonina
 SHH: Sonic Hedgehog
 smac/diablo: second mitochondria-derived activator of caspase/ direct IAP binding protein with low pI
 SNC: Sistema nervioso central
 SNpc: Sustancia Nigra pars compacta
 SOX2: SRY-box containing gene 2
 SPECT: tomografía computerizada de emisión de un fotón
 SPIO: partícula superparamagnética de óxido de hierro
 Stat1/3: Signal Transducers and Activator of Transcription 1/3
 SVZ: Zona Subventricular
 SSC-H: Side Scattered
 TGF- β : transforming growth factor, beta 1
 TH: Tirosina Hidroxilasa
 VOCCs: canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje
 VMAT-2: Vesicular Mono-amine transporter
 vs: versus
 VTA: Área del tegmento ventral
 v-myc: v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)
 WB: Western Blot
 WNT: wingless-related MMTV integration site

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. TERAPIA CELULAR EN LA ENFERMEDAD DE PARKINSON.

Las enfermedades neurodegenerativas tienen cada vez más incidencia en los países desarrollados, debido en gran medida al envejecimiento de su población. La enfermedad de Parkinson es un desorden crónico, neurodegenerativo y progresivo caracterizado por la pérdida continua y selectiva de las neuronas dopaminérgicas localizadas en la Sustancia Negra *pars compacta*, que conlleva a una reducción del neurotransmisor dopamina liberado en la región que inervan principalmente estas neuronas, el estriado. Una reducción del 70% de la dopamina en el estriado desencadena los síntomas motores típicos asociados a esta enfermedad como rigidez, temblor y bradiquinesias (Dunnett and Bjorklund, 1999; Lang and Lozano, 1998) (Dunnett and Bjorklund, 1999). Un pequeño porcentaje de los casos tienen como origen de la enfermedad causas genéticas, mientras que la gran mayoría ocurren por causas idiopáticas. Las razones para la degeneración selectiva de este tipo de neuronas continúa sin aclararse, pero puede deberse a la ausencia o mal funcionamiento de enzimas, neurotransmisores, factores tróficos o a la presencia de sustancias tóxicas (Dunnett and Bjorklund, 1999; Lotharius et al., 2002). La enfermedad es poco común en individuos menores de 60 años, pero su proporción aumenta partir de esa edad, afectando en Europa al 1,8% de la población entre 60-65 años, al 2,5% entre 65-69 años y al 2,6% entre 85-89 años (de Rijk et al., 2000).

Actualmente, existen tres formas de abordar el tratamiento de la enfermedad de Parkinson: la terapia farmacológica, la estimulación cerebral profunda y las terapias de reemplazamiento celular. La terapia farmacológica consiste en la aplicación de drogas agonistas de la dopamina como L-3,4-dihidroxifenilalanina o L-DOPA, que puedan suplir el déficit de dopamina en el sistema nigroestriatal y así mejorar los síntomas motores de la enfermedad. En estados avanzados de la enfermedad, la respuesta a estas drogas se vuelve menos satisfactoria y el paciente acaba desarrollando otros síntomas como desórdenes de equilibrio, ausencia de movimiento, demencia y cambios afectivos (Chase and Oh, 2000; Martin and Wieler, 2003). Para los casos más avanzados de la enfermedad que ya presentaban complicaciones motoras, se desarrollaron los tratamientos de estimulación eléctrica cerebral profunda. La estimulación eléctrica, especialmente del núcleo subtalámico, puede mejorar las funciones motoras del

paciente, reduciendo el empleo de drogas en su tratamiento y, por tanto, disminuyendo la aparición de disquinesias (Benabid, 2003). Sin embargo, estos dos procedimientos son tratamientos sintomáticos que no frenan la progresión de la enfermedad ni reparan el sistema dopaminérgico degenerado. Para ello era necesario un abordaje de la enfermedad innovador que buscase reemplazar la población dopaminérgica dañada. Hace más de 30 años que comenzaron las primeras pruebas con trasplantes de tejido mesencefálico (embrionario o fetal) humano cuyo objetivo era reponer las neuronas dopaminérgicas perdidas en los enfermos de Parkinson (Brundin et al., 1987). Pese a los resultados contradictorios o adversos encontrados durante los años siguientes (Freed et al., 2001; Hagell and Cenci, 2005; Olanow et al., 2003), una parte de los pacientes que recibieron este tipo de tratamiento experimentaron una mejoría en sus síntomas, como un aumento en la velocidad de sus movimientos y la reducción de su rigidez, demostrándose además la integración y la supervivencia de los trasplantes varios años después de la cirugía (Brundin et al., 2000a; Brundin et al., 2000b; Hauser et al., 1999). Estos resultados positivos constituyeron la prueba de principio de que el reemplazamiento celular en la enfermedad de Parkinson era una buena estrategia para abordar la enfermedad, aunque fuese necesario mejorar algunos aspectos. Sobre todo había que unificar protocolos, establecer cuál es el mejor tipo de tejido/células utilizado en los trasplantes y hacer una selección previa de los pacientes candidatos a este tipo de terapia. Además, antes de proseguir con las pruebas clínicas era necesario definir otras cuestiones como encontrar una fuente estable de neuronas dopaminérgicas alternativa al tejido embrionario o fetal humano, debido a las cuestiones éticas y de obtención que plantea su uso rutinario. Para ello, en la última década han proliferado numerosos estudios centrados en la obtención de neuronas dopaminérgicas *in vitro* a partir de diversas fuentes como: células madre embrionarias (ESC), células madre neurales (NSC), células madre del adulto y las células madre pluripotentes inducidas (IPs) (ver figura 1). Todas ellas presentan ventajas y desventajas a la hora de generar neuronas dopaminérgicas y aún no han pasado a la fase de ensayos clínicos.

Las ESC son células pluripotentes, con capacidad de auto-renovación y, tanto las de origen murino como de primate y humano, pueden diferenciarse hacia precursores neurales y neuronas dopaminérgicas. Para mejorar el número de neuronas dopaminérgicas obtenido a partir de ESC se han seguido diferentes aproximaciones como: i) utilizar factores solubles específicos del cerebro medio durante su cultivo (SHH, FGF8, GDNF, dbAMPc, BDNF... (Lee et al., 2000; Park et al., 2005; Park et al., 2004; Rolletschek et al., 2001; Takagi et al., 2005; Yamazoe et al., 2006); ii) el co-cultivo con células de soporte o *feeders* (células estromales PA6, astrocitos (Barberi et al., 2003; Kawasaki et al., 2000)); iii) la modificación genética de las ESC

para sobre-expresar genes que promuevan su diferenciación hacia un fenotipo dopaminérgico (*NURR1*, *PITX3*, *MASH1*, *MXS1*, *LMX1a* (Andersson et al., 2006; Chung et al., 2005; Kim et al., 2006; Kim et al., 2002; Martinat et al., 2006; Sonntag et al., 2004). Varios estudios han descrito la generación eficiente de neuronas dopaminérgicas *in vitro* tras la expansión de ESC humanas y su co-cultivo con células estromales PA6 (Park et al., 2005; Zeng et al., 2004) o mediante la selección y posterior expansión de precursores neuronales (Cho et al., 2008). A pesar de que sea posible la generación *in vitro* de neuronas dopaminérgicas a partir de ESC, existen diversos problemas en la actualidad que impiden que sean una fuente de neuronas dopaminérgicas utilizables a nivel clínico en humanos. Estos problemas vienen derivados de su cultivo con suero, el co-cultivo con otros tipos celulares de origen animal y por la posibilidad de generación de teratomas debido a la proliferación no controlada y a la inestabilidad cromosómica observada en este tipo de células.

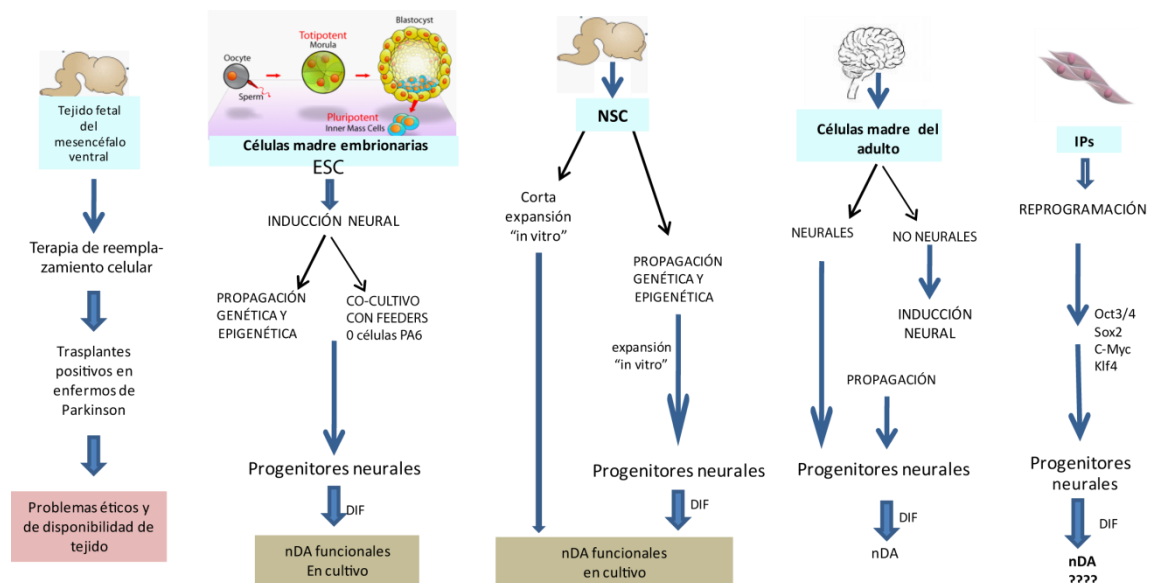


Fig. 1. Diferentes fuentes de células utilizadas en la actualidad para la obtención de neuronas dopaminérgicas.

Las NSC son células multipotentes derivadas de tejido nervioso (fetal o adulto) que poseen la capacidad de generar células de los tres linajes principales del sistema nervioso: neuronas, oligodendrocitos y astrocitos (Svendsen et al., 1999). En este caso, sólo las NSC derivadas de la región del mesencéfalo ventral durante la edad apropiada del desarrollo, se diferencian hacia neuronas dopaminérgicas maduras y funcionales (Storch et al., 2001). Una vez puestas en cultivo, el porcentaje de neuronas dopaminérgicas generado depende de la edad del tejido donante, el tiempo y las condiciones del de cultivo *in vitro* (Jensen and Parmar, 2006). En general, el porcentaje de células TH positivas obtenido es bajo, no siendo superior al 2% del total de células del cultivo (Svendsen et al., 1997). Diferentes combinaciones de

factores solubles (Interleucina-1, GDNF, forskolina, dbAMPC...) en el medio de cultivo, permite incrementar este porcentaje hasta encontrar un 4-10% de células TH positivas en los cultivos (Christophersen et al., 2006) (Perrone-Capano et al., 2000; Vescovi et al., 1999). Otros grupos han utilizados diferentes protocolos para promover/mantener el número de neuronas dopaminérgicas a partir de cultivos de NSC, como la sobre-expresión de factores de transcripción relacionados con el desarrollo del sistema dopaminérgico. La sobre-expresión de NGN2 o MASH1 en precursores mesencefálicos induce neurogénesis, pero no aumenta el número de neuronas dopaminérgicas generadas en los cultivos. La sobre-expresión de Nurr1 en NSC de rata, incrementa el número de células que expresan TH, pero éstas pueden ser neuronas o glía, por lo que no ocurre una activación específica neuronal del enzima (Kim et al., 2007). La co-expresión de NURR1 con Bcl-X_L+SHH o MASH1 en NSC de cerebro anterior de rata, es capaz de generar células TH positivas que sintetizan y liberan dopamina, son capaces de recapturar dopamina a través de DAT y presentan unas propiedades electrofisiológicas de neuronas maduras (Park et al., 2006). Estos resultados han sido obtenidos a partir de precursores corticales de rata y, aunque tras su trasplante en modelos hemiparkinsonianos se observaron mejoras en el movimiento de los animales trasplantados, en ningún momento se comprobó el fenotipo de las células TH positivas generadas ni la expresión de factores importantes para el desarrollo de neuronas dopaminérgicas maduras de tipo A9. También se ha descrito que la co-expresión de NURR1 y FOXA2 en NSC corticales de rata induce la generación de células TH positivas con un fenotipo A9 (expresan *DAT*, *VMAT2*, *GIRK2*, *PITX3*, *AHD2*) y una morfología madura (*VMAT2* positivas y con un extenso crecimiento de neuritas) (Lee et al., 2010). Sin embargo, en humanos la sobre-expresión de NURR1 no es suficiente para inducir un fenotipo dopaminérgico ya que la regulación génica de TH en humano es diferente de los sistemas de ratón y rata y no depende de NURR1 (Jin et al., 2006).

El problema del uso de NSC es que, tras largos periodos de tiempo en cultivo, los porcentajes de neuronas dopaminérgicas disminuyen drásticamente. Este problema de pérdida de pluripotencialidad de las NSC con los pases ha sido ampliamente descrito. Los primeros estudios se centraron en el cultivo de neuroesferas obtenidas a partir de tejido mesencefálico fetal (Storch et al., 2001; Svendsen et al., 1998). Pronto se descubrió que al mantener estos cultivos durante medios-largos periodos de tiempo, se producía una drástica reducción en el número de neuronas dopaminérgicas generadas (Chung et al., 2006; Studer et al., 2000; Svendsen et al., 1996). Para abordar este problema se han llevado a cabo diversos estudios de inmortalización en líneas derivadas de NSC (Liste et al., 2004; Paul et al., 2007). La expresión de genes como *v-myc* permite la expansión *in vitro* de los progenitores sin que haya una pérdida

de capacidad neurogénica con los pases, obteniendo tras su cultivo *in vitro* un alto porcentaje de células TH positivas (Lotharius et al., 2002; Paul et al., 2007).

El uso de NSC como fuente de neuronas dopaminérgicas tiene ventajas sobre las ESC, ya que tienen un menor índice de generación de tumores tras su trasplante en modelos hemiparkinsonianos de roedor. Además, poseen una estabilidad genómica mayor, ya que las ESC pueden mostrar cambios a nivel cromosómico (Cowan et al., 2004; Maitra et al., 2005).

Las células madre derivadas del adulto despiertan un interés especial debido a la posibilidad que ofrecen a la hora de realizar auto-trasplantes, que no presentarían rechazo inmunológico en el paciente. Las células madre neurales adultas se encuentran en dos regiones neurogénicas: el hipocampo y la zona subventricular de los ventrículos laterales (SVZ). Bajo condiciones normales no tienen la capacidad de generar neuronas dopaminérgicas. Sin embargo, dos grupos de investigación han logrado generar neuronas dopaminérgicas a partir de NSC adultas de SVZ. Uno mediante el protocolo de inducción en cinco pasos típicamente utilizado con ESC (Papanikolaou et al., 2008), y el otro sobre-expresando NURR1 en los precursores de SVZ (Shim et al., 2007). Sin embargo, las neuronas dopaminérgicas generadas no presentan las propiedades típicas del mesencéfalo ventral. A partir de células madre del adulto derivadas la médula ósea (mesenquimales o MSCs) también se han obtenido células de tipo NSC (expresan nestina y musashi) que posteriormente diferencian hacia neuronas y glía (Fu et al., 2008; Hermann et al., 2004).

Otra fuente de neuronas dopaminérgicas para terapia de re-emplazamiento celular en la enfermedad de Parkinson podrían ser las células madre pluripotentes inducidas o iP. En 2006 el grupo de Takahashi y Yamanaka consiguió inducir pluripotencialidad en fibroblastos de ratón mediante la sobre-expresión en estas células de cuatro factores de transcripción: oct3/4, Sox2, c-Myc y KLF4 (Takahashi and Yamanaka, 2006). Estudios posteriores realizados con esta metodología, intentan generar células pluripotentes a partir de células somáticas de los propios pacientes (Welstead et al., 2008). Recientemente se ha publicado la obtención de neuronas dopaminérgicas a partir de IPs (Cooper et al., 2010).

En resumen podemos decir que los primeros trasplantes realizados en enfermos de Parkinson con tejido fetal fresco mesencefálico humano establecieron la prueba de principio de que la terapia de reemplazamiento celular podría ser efectiva en el tratamiento de esta enfermedad. A partir de entonces se han llevado a cabo distintas estrategias para obtener una fuente estable y duradera de progenitores neuronales que den lugar a un elevado número de neuronas dopaminérgicas con fenotipo de Sustancia Negra *pars compacta*. Este trabajo de tesis doctoral, va encaminado al estudio en profundidad de una línea celular humana derivada

del mesencéfalo ventral de fetos abortados a 10 semanas de gestación e inmortalizada con v-myc a nivel de generación de neuronas dopaminérgicas en cultivo para su posterior seguimiento en trasplantes realizados en modelos hemiparkinsonianos de roedor.

2. LAS NEURONAS DOPAMINÉRGICAS DEL GRUPO A9.

La dopamina es un neurotransmisor catecolaminérgico del sistema nervioso central de los vertebrados. En su ruta de biosíntesis el enzima tirosina hidroxilasa (TH) convierte el aminoácido esencial tirosina en L-dihidroxifenilalanina (L-DOPA), que a su vez es decarboxilada por la decarboxilasa de L-aminoácidos aromáticos (AADC) para producir dopamina. Dentro del cerebro de los mamíferos existen diversos grupos de neuronas dopaminérgicas (ver figura 2):

- las localizadas en el cerebro medio están distribuidas en diversos núcleos: la Sustancia Negra *pars compacta* (A9), el área del tegmento ventral (A10) y el campo retrorrubral (A8).
- en el diencefalo encontramos los grupos A11-A15 (tálamo e hipotálamo).
- en el telencéfalo hallamos el grupo de las neuronas dopaminérgicas del bulbo olfatorio (A16) y la retina (A17).

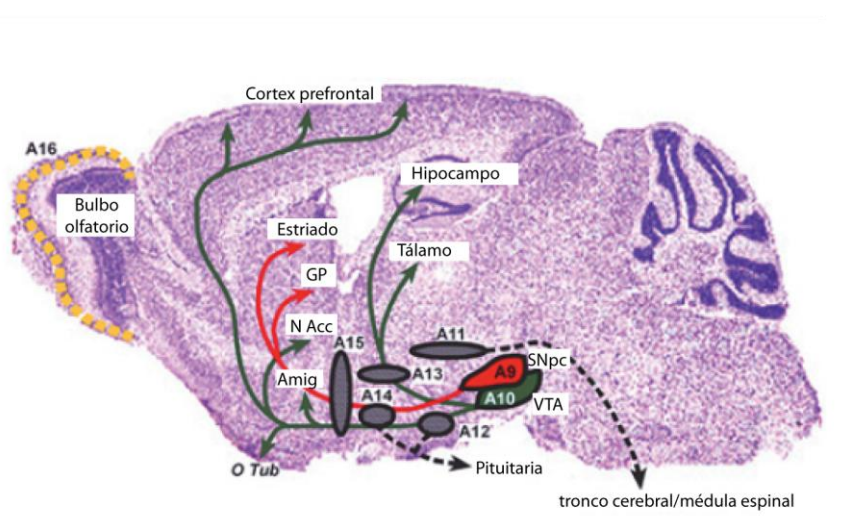
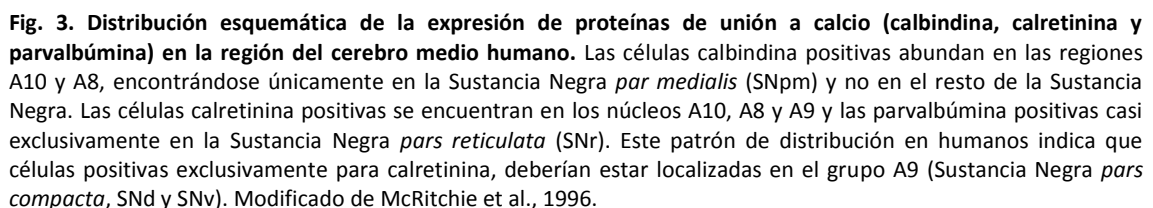


Fig. 2. Localización y proyecciones axonales de los diferentes grupos de neuronas dopaminérgicas, en una vista sagital del cerebro del ratón adulto. Los grupos mesencefálicos A9 (Sustancia Negra *pars compacta*, SNpc) y A10 (área tegmental ventral, VTA) proyectan al estriado dorsolateral (núcleo caudado y putamen) y al globo pálido (GP), o hacia el estriado medioventral (núcleo accumbente, NAcc), la amígdala (Amig), el tubérculo olfatorio (OTub) o el cortex prefrontal. El grupo A10 establece conexiones adicionales con las regiones de tálamo y el hipocampo. Las líneas punteadas grises indican la posición aproximada de los grupos A11-A15 y sus proyecciones descendientes hacia la médula espinal y el tallo cerebral. La inervación de la pituitaria por el sistema tuberohipofisial/tuberoinfundibular también se indica con una línea punteada gris y una flecha. El grupo telencefálico A16 está formado por interneuronas del bulbo olfatorio (línea punteada amarilla). Modificado de Prakash and Wurst, 2006.



El grupo de neuronas dopaminérgicas A9 participa en el control de la actividad motora regulado a través de la compleja vía de los ganglios basales. Los ganglios basales también están implicados en el aprendizaje asociativo, la memoria y las emociones. En la vía del control motor participan distintos núcleos cerebrales: la información recogida en el cortex pasa a través del estriado (putamen y globo pálido) hacia la sustancia negra y el núcleo subtalámico, generándose de manera directa o indirecta una señal de respuesta que, a través del tálamo, transmitirá una orden de respuesta a la corteza somato-motora (ver figura 4a) (Smith and Bolam, 1990).

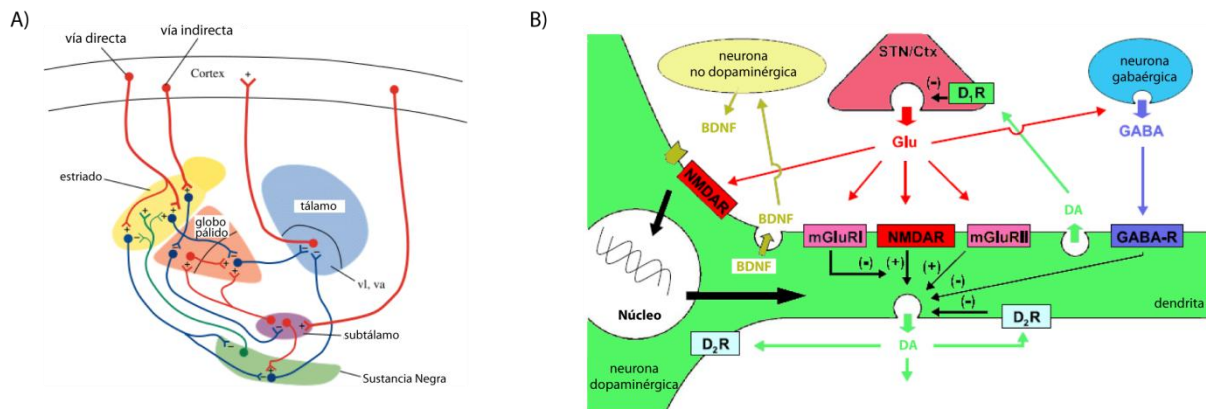


Fig. 4. A) Conexiones principales del circuito motor de los ganglios basales. El estriado recibe información procedente del cortex a través de terminaciones glutamatérgicas (excitatorias, rojo). Esta información fluye desde el estriado hacia la Sustancia Negra *pars compacta*. Las neuronas dopaminérgicas de la SNpc emiten proyecciones hacia el estriado. La dopamina allí liberada activa dos tipos de receptores D1 (excitatorios) o D2 (inhibitorios) que determinan como continuará el flujo de información: mediante la vía directa (SN-tálamo-corteza o globo pálido-tálamo-corteza) o indirecta (vía globo pálido-subtálamo-SN-tálamo-corteza). A lo largo del circuito, se establecen sinapsis gabaérgicas (inhibitorias, azul), glutamatérgicas (excitatorias, rojo) y dopaminérgicas (verde, moduladoras) entre los distintos núcleos que forman los ganglios basales, produciendo finalmente una orden de respuesta que llega hasta la corteza.

B) Dibujo esquemático mostrando las interacciones mediadas por neurotransmisores en las que está implicada una neurona dopaminérgica. El glutamato (Glu) liberado desde el cortex o el núcleo subtalámico activa postsinápticamente a los receptores tipo NMDA y/o mGluR II, de las neuronas dopaminérgicas del grupo A9, provocando la liberación de dopamina. Este efecto inducido a través de los NMDA-R en la región dendrítica de las neuronas dopaminérgicas, puede ser regulado negativamente por la interacción de estos receptores con los mGluR tipo I. A su vez, la dopamina liberada puede ejercer, vía receptores D1 presentes en las neuronas glutamatérgicas, un control inhibitorio de la liberación de Glu hacia la Sustancia Negra. Además, la dopamina liberada puede producir también, vía autorreceptores D2, efectos autoinhibitorios, regulando la cantidad de dopamina que se sintetiza/libera tras la despolarización de las neuronas y la liberación del neurotransmisor al espacio sináptico. El incremento de la señal mediada por Glu hacia la Sustancia Negra puede inducir, vía activación de NMDAR, una mayor expresión de BDNF en esta área del cerebro. Este factor neurotrófico está implicado en diversas funciones, como la regulación de la expresión de diferentes subunidades de los NMDAR, mGluR y receptores D3 de dopamina. La liberación de Glu también induce la liberación de GABA en las neuronas gabaérgicas presentes en el circuito de los ganglios basales. La unión de GABA a los receptores de GABA presentes en las neuronas dopaminérgicas, inhibiría la liberación de dopamina en estas neuronas. Modificado de Bustos et al., 2004.

Se requiere una fina regulación de la excitabilidad neuronal dentro de cada núcleo para un buen funcionamiento del circuito. Dentro de ellos, la sustancia negra constituye uno de los principales núcleos de integración y salida de información en la coordinación de la

actividad motora. Las neuronas localizadas en ella emiten sus conexiones rostralmente hacia el cuerpo estriado. Reciben información de neuronas gabaérgicas o glutamatérgicas localizadas en otros núcleos del circuito de los ganglios basales, ejerciendo una función moduladora al liberar dopamina. Por tanto, es importante que las neuronas dopaminérgicas generadas a partir de cultivos *in vitro* están dotadas de los receptores de neurotransmisores necesarios para glutamato (ionotrópicos y metabotrópicos) y GABA (tipo A y B) y así puedan modular la liberación de dopamina, ya sea mediante la interacción con otros neurotransmisores o mediante su autorregulación por unión de la dopamina extracelular con los receptores tipo DRD2 (ver figura 4b)(Bustos et al., 2004; Meltzer et al., 1997; Smith and Kieval, 2000; Tepper et al., 1987).

Las neuronas dopaminérgicas de este grupo A9 poseen unas propiedades electrofisiológicas características. Dichas propiedades difieren si los estudios se realizan *in vivo* o *in vitro*. Sus características distintivas *in vitro* son: potenciales de acción largos (≥ 2 ms), un alto umbral de despolarización (-30 a -40mV), una etapa inicial del potencial de acción bifásica con un pequeño hombro inicial, un pico con una amplitud de +30mV, una prominente y larga fase de hiperpolarización y una marcada capacidad de rectificación en respuesta a la aplicación de corrientes hiperpolarizantes (ver figura 5 a y b) (Arbuthnott et al., 1985; Fisher et al., 1991; Sorensen et al., 2005), Liss B & Roeper J 2010).

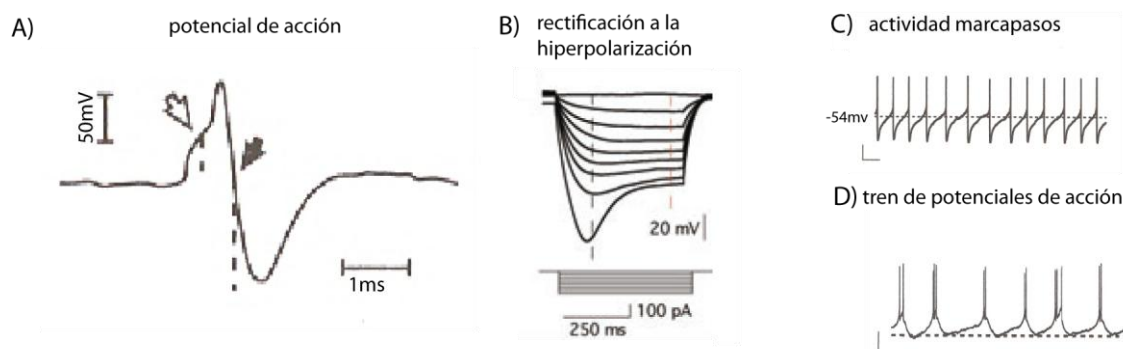


Fig. 5. Propiedades electrofisiológicas de las neuronas dopaminérgicas de la Sustancia Negra pars compacta.

A) potencial de acción típico de estas neuronas en el que podemos apreciar un “hombro” en el segmento inicial de la despolarización (flecha blanca), un umbral de despolarización entre -30 y -40mV, un pico de unos 50mV y más de 2ms de amplitud, que muestra una larga fase de hiperpolarización (flecha negra) antes de recuperar el potencial de membrana en reposo. B) Estas neuronas además presentan una marcada rectificación del potencial de membrana en respuesta a la aplicación de una serie de corrientes de hiperpolarizantes. C) Poseen una actividad electrofisiológica espontánea y constante “*in vitro*” denominada actividad marcapasos. D) Además, tienen la capacidad de generar varios potenciales de acción en respuesta a un estímulo, formando los llamados trenes de potenciales de acción. Modificado de Liss B. y Roeper J., 2010 y Sorensen et al., 2005.

Además, las neuronas dopaminérgicas de este grupo A9 presentan *in vitro* un comportamiento característico denominado actividad en marcapasos (ver figura 5c), mostrando una actividad electrofisiológica constante, al generar de manera regular y tónica

potenciales de acción de baja frecuencia. Además, aunque se encuentren en un sistema *in vitro* (sin las señales aferentes que las activarían en el sistema de los ganglios basales) presentan oscilaciones espontáneas en los niveles de calcio intracelular, producidas por la neurotransmisión glutamatérgica, al ser inhibidas por antagonistas de receptores de glutamato tipo NMDA. (Yasumoto et al., 2004). Sin embargo, *in vitro* la generación espontánea de trenes de potenciales de acción completos es muy escasa (figura 5d). Esto indica que no es una capacidad intrínseca de este tipo de neuronas, si no que puede ser inducida mediante estímulos eléctricos o por la activación de los receptores de glutamato NMDA.

Por tanto, a la hora de generar una fuente estable de neuronas dopaminérgicas *in vitro*, es importante estudiar su funcionalidad mediante el análisis de su actividad electrofisiológica y la expresión de receptores de neurotransmisores funcionales que están implicados en la regulación de la misma dentro del sistema nigroestriatal.

3. DESARROLLO DEL CEREBRO MEDIO Y CONTROL GENÉTICO DE LA APARICIÓN DE LAS NEURONAS DOPAMINÉRGICAS DEL GRUPO A9.

Las neuronas dopaminérgicas de la Sustancia Negra *pars compacta* se desarrollan tras un complejo periodo de regionalización y especificación de progenitores durante el desarrollo embrionario y la formación del tubo neural (Abeliovich and Hammond, 2007; Orme et al., 2009; Prakash and Wurst, 2006). Los precursores de los grupos A8, A9 y A10 se localizan en la curvatura cefálica que comprende la región ventral del mesencéfalo y el diencefalo (figura 6). La medialínea ventral del tubo neural en esta región se considera la *floor plate* a partir de la cual se generan todos los tipos de neuronas dopaminérgicas en función de su posición antero-posterior a lo largo del eje cerebro medio/caudal. La generación de ratones modificados genéticamente proporcionó un gran avance para el análisis de las funciones génicas durante el desarrollo embrionario y su función en el sistema nervioso central. La expresión de genes como OTX2 y GBX2 establece el límite entre cerebro anterior-medio y posterior (ver figura 6a). Una vez establecido este límite, la región comprendida entre el cerebro medio caudal y el cerebro posterior más rostral actúa como un organizador secundario que libera diversas moléculas señalizadoras (Fgf8, Wnts y Shh). La correcta combinación de ellas, tanto espacial como temporal, provoca que en la región del cerebro medio denominada *floor plate*, se den las condiciones adecuadas para que en ella surjan los precursores dopaminérgicos (figura 6b). Dichos precursores deben mantenerse en un estado proliferativo y pluripotente para alcanzar

un número elevado. La expresión de genes como *Sox2* se encarga de ello y además, confiere a los progenitores una identidad neural.

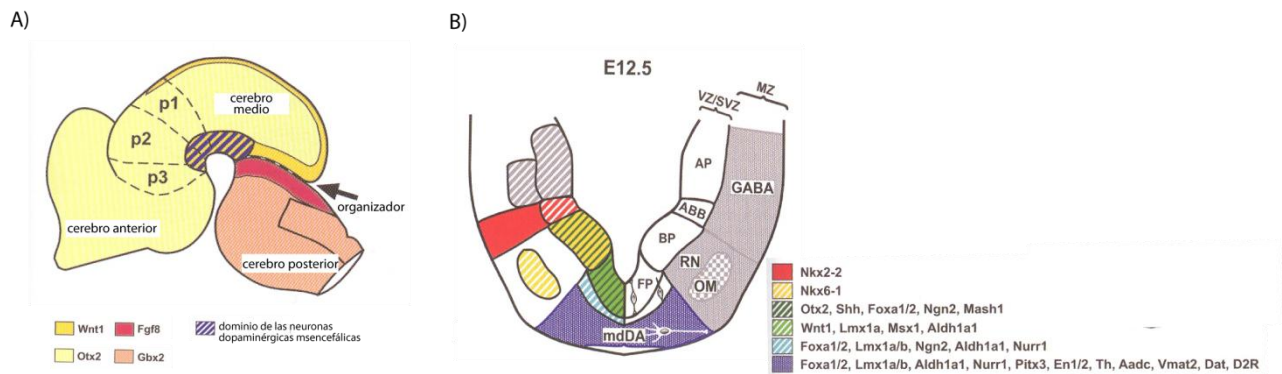


Fig. 6. Desarrollo en cuatro dimensiones de las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas.

A) Primera dimensión: posicionamiento antero/posterior (A/P). Vista sagital del tubo neural durante la gestación media-final del embrión de ratón (E10,5-E12,5) mostrando el dominio dentro de la flexión céfalica a partir de la cual surgen las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas (franja azul). Esta área comprende el dominio ventral del cerebro medio y el diencefalo caudal. El gen *OTX2* se expresa en el cerebro medio y anterior (amarillo) mientras que *GBX2* está expresado en la región rostral del cerebro posterior (naranja). La zona entre cerebro medio y posterior (organizador, flecha) se sitúa en el área de intersección de la expresión de estos dos factores de transcripción. En esta zona, a partir de E10,5 comienza la expresión de *Wnt1* que se extiende hacia el cerebro medio, rodeando la región del organizador (ocre) y de *Fgf8* alrededor de la zona más rostral del cerebro posterior (rojo). La combinación correcta de estas señales, hace que en una determinada región del cerebro medio se establezca el dominio donde se generarán los progenitores dopaminérgicos. Modificado de Wurster W y Prakash N. 2010.

B) Segunda y tercera dimensión: posicionamiento dorsoventral (D/V) y medio lateral. Vista coronal del tubo neural durante el final de la gestación (E12,5) del embrión de ratón, mostrando el dominio progenitor dentro de la floor plate (FP) a partir del cual surgen las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas (mdDA). La expresión de distintos factores de transcripción junto con la presencia de diversos factores secretados, es necesaria para la diferenciación correcta de los progenitores localizados en la FP en mdDA. Los progenitores proliferativos de las mdDA se encuentran localizados en la región ventricular y subventricular (VZ/SVZ) de la FP del cerebro medio. Una vez que se vuelven postmitóticos, estos progenitores migran hasta alcanzar su posición final en la SNpc y el VTA. La expresión de *Wnt1*, *Lmx1a* y *Msx1* está restringida a la FP y es necesaria para la neurogénesis adecuada de los progenitores de mdDA localizados en VZ/SVZ. *Msx1* reprime la expresión de *Nkx6.1* dentro de la FP. La expresión de *Aldh1a1* en estas células, sirve como marcador de progenitores de mdDA. La expresión de *Otx2*, *Shh*, *Foxa1/2*, *Ngn2* y *Mash1*, se encuentra en la FP pero también en los progenitores de la placa basal (BP). Estos factores secretados y de transcripción juegan un papel importante en la neurogénesis de los mdDA. Por ejemplo, *Otx2* es necesario para reprimir la expresión de *Nkx2* e impedir que se desarrollen neuronas serotoninérgicas. Los precursores mdDA postmitóticos deben expresar *Foxa1/2*, *Lmx1a/b*, *Ngn2*, *Nurr1* y *Aldh1a1* para que puedan diferenciarse correctamente como mdDA. Las neuronas dopaminérgicas diferenciadas adultas deben expresar además *Foxa1/2*, *Lmx1a/b*, *Aldh1a1*, *Nurr1*, *Pitx3*, *En1/2*, *TH*, *AADC*, *VMAT2*, *DAT* y *DRD2*. ABB, banda alar-basal; AP, placa alar; BP, placa basal; FP, floor plate; mdDA, neuronas dopaminérgicas del cerebro medio; MZ, zona del manto; OM, núcleo oculomotor; RN, núcleo rojo; VZ/SVZ, región ventricular y subventricular. Modificado de Wurster W. y Prakash N. 2010.

Posteriormente, se inicia una etapa en la que la activación más o menos secuencial de diversos factores de transcripción va confiriendo el carácter dopaminérgico a estos precursores neurales (figura 7). La expresión de *Lmx1a*, *Msx1*, *Neurogenina2* y *Mash1* es

necesaria para la neurogénesis de los precursores mesencefálicos y la represión de la adquisición de un fenotipo glial o neuronal no dopaminérgico por su parte.

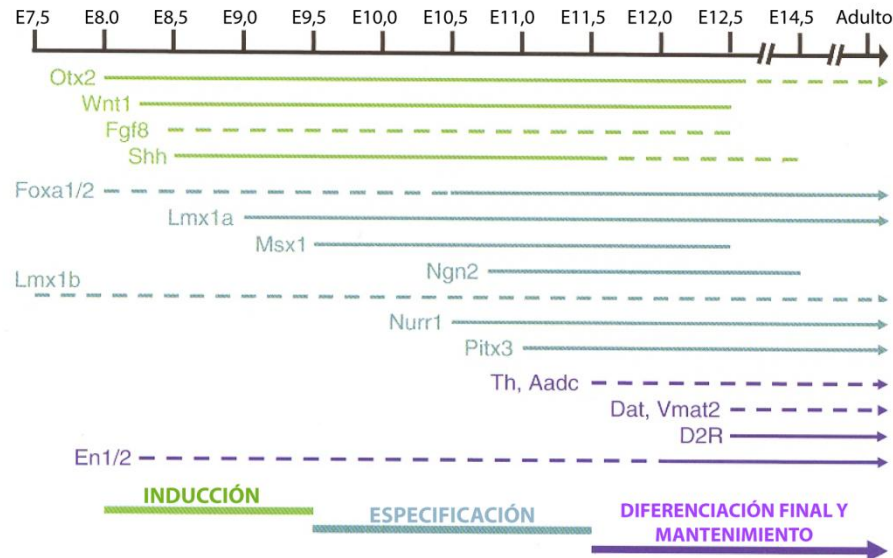


Fig. 7. Desarrollo en cuatro dimensiones de las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas. La cuarta dimensión: el momento del desarrollo. Representación esquemática de la expresión de genes implicados en la aparición de las neuronas dopaminérgicas durante el desarrollo embrionario del ratón desde E7,5 hasta el adulto. El código de colores sirve para asociar la expresión de cada gen (factor secretado, factor de transcripción o enzima) a un periodo específico del desarrollo de las neuronas dopaminérgicas: inducción, especificación o diferenciación final y mantenimiento. Las líneas punteadas indican que todavía no se ha demostrado una acción directa de dicho gen sobre el desarrollo de las neuronas dopaminérgicas durante esa etapa concreta del desarrollo embrionario. Las flechas al final de las líneas de expresión indican que la expresión de ese gen se mantiene en el adulto. Modificado de Wurst W. y Prakash N. 2010.

Una vez especificados los precursores mesencefálicos, estos deben adquirir un compromiso hacia una diferenciación dopaminérgica. La expresión de *Nurr1* hace que los progenitores neuronales salgan de su estado proliferativo y empiecen a expresar genes relacionados con el fenotipo dopaminérgico (TH) iniciando parte de su programa de diferenciación. Sin embargo, no actúa sobre otros genes implicados en la maduración de las neuronas dopaminérgicas. Otros factores de transcripción como *En1* y *Lmx1b* se expresan en estos momentos. Aunque no son indispensables para la generación de neuronas TH positivas, participan en su correcta generación y están implicados también en su correcta supervivencia en el adulto. *Nurr1* también es importante para la correcta activación de otro factor de transcripción, PITX3. Se ha visto que pueden actuar juntos modulando directamente la actividad del promotor de TH. Además, la expresión de *Pitx3* es esencial para que se active la expresión del resto de genes que incluyen enzimas y transportadores (*Dat*, *Vmat2*, *Girk2*, *Drd2*) necesarios para la maduración, funcionalidad y supervivencia de las neuronas dopaminérgicas.

Por tanto, a la hora de generar neuronas dopaminérgicas in vitro hay que tener en cuenta todos estos pasos y estudiar el patrón de expresión de los factores de transcripción implicados en su desarrollo. La inactivación de uno de ellos puede generar neuronas TH positivas pero que no posean un fenotipo dopaminérgico completo y maduro y funcional.

4. TRASPLANTE DE NEURONAS DOPAMINÉRGICAS EN MODELOS HEMIPARKINSONIANOS DE RATA. SEGUIMIENTO DE SU EVOLUCIÓN MEDIANTE TÉCNICAS DE IMAGEN.

Tras los primeros trasplantes realizados hace más de 30 años con tejido mesencefálico fetal fresco humano a enfermos de Parkinson, este procedimiento no ha llegado a ser rutinario debido a los problemas en la obtención del tejido y a la necesidad de mejorar y unificar protocolos. El potencial de la terapia de esta enfermedad utilizando trasplantes pasó al ámbito de la experimentación con animales de laboratorio para poder mejorar aspectos como la funcionalidad y la supervivencia de los mismos. Varias neurotoxinas han sido utilizadas para inducir la pérdida de neuronas dopaminérgicas y generar modelos animales de enfermedad de Parkinson. Entre ellas las más usadas son la 6-hidroxidopamina (6-OHDA) en rata y la 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) en ratón. La toxicidad de la 6-OHDA es relativamente específica de las células catecolaminérgicas. El compuesto 6-OHDA es internalizado mediante el transportador DAT de las neuronas dopaminérgicas y la muerte celular se produce al generar en su interior productos citotóxicos como peróxido de hidrógeno, superóxido o radicales hidroxilo (Cohen and Heikkila, 1974; Heikkila and Cohen, 1973). La administración de 6-OHDA en el haz prosencefálico medial (definido en inglés como MFB: *medial forebrain bundle*) del cerebro de rata provoca la degeneración del sistema nigroestriatal (Sauer and Oertel, 1994; Yuan et al., 2005). Los animales con una lesión bilateral deben recibir cuidados especiales y tienen que ser alimentados, por lo que no son un modelo óptimo para la investigación. Las ratas con una lesión del sistema nigroestriatal unilateral sobreviven sin estos problemas y presentan una descompensación sensorial-motora que induce al animal a moverse en círculos de manera espontánea o tras la administración de drogas. Los test de rotación inducida por drogas (anfetamina y apomorfina) se usan para determinar el grado de la lesión producida por la neurotoxina (Iancu et al., 2005; Yuan et al., 2005). Durante las últimas décadas se han realizado numerosos estudios de trasplantes en modelos

hemiparkinsonianos de rata con neuronas dopaminérgicas procedentes de distintas fuentes celulares (ESC, NSC y SC del adulto, ver tabla 1). Sólo las neuronas dopaminérgicas con propiedades del grupo A9 han mostrado la capacidad de establecer conexiones sinápticas funcionales con el estriado lesionado (Haque et al., 1997; Schultzberg et al., 1984).

TIPO	FUENTE	Supervivencia del trasplante	Recuperación en modelos 6-OHDA	Conclusiones
tejido MV	embriones humanos o de rata	excelente	sí	problemas con la disponibilidad del tejido para uso clínico
ESC	líneas humanas o de ratón	buena	buena	problemas relacionados con la aparición de tumores
NSC	fetos humanos, de rata o ratón	moderada	pobre	baja supervivencia, diferenciación limitada y migración
SC del adulto	autotrasplante	pobre	pobre	eficacia baja en diferenciación neuronal
NSC del adulto	frescas o de bancos celulares	pobre	pobre	evidencias limitadas de diferenciación específica o eficacia

Tabla 1. Resultados de los trasplantes realizados a partir de la distintas fuentes alternativas de neuronas dopaminérgicas en modelos hemiparkinsonianos de roedor.

Modificado de Dunnet S.B. y Björklud A. 2010.

Los modelos clásicos de análisis de los trasplantes experimentales consistían en la realización de test de comportamiento para evaluar el efecto del mismo en la función motora del animal, y su posterior procesamiento histológico para analizar el grado de diferenciación, integración en el sistema nigroestriatal y supervivencia de las células trasplantadas. En la actualidad, las terapias de reemplazamiento celular de la enfermedad de Parkinson realizadas en animales de experimentación, tratan de sustituir estas técnicas por otras más sensibles de imagen (no invasivas) que permitan detectar si hay una mejora a nivel bioquímico del sistema dopaminérgico y que pudiesen ser aplicadas en un futuro a pacientes trasplantados con enfermedad de Parkinson. Estas técnicas permitirían además, el seguimiento a lo largo del tiempo de la integración y maduración de las células trasplantadas en un mismo animal. Mediante imagen de resonancia magnética (IRM) y estudios volumétricos en pacientes de Parkinson se han podido localizar regiones en las que ha habido una reducción en el volumen cerebral (Summerfield et al., 2005). Utilizando radiotrazadores detectables mediante tomografía de emisión de positrones (PET) y tomografía de emisión computerizada de un fotón (SPECT), se realizan estudios diagnósticos de la enfermedad de Parkinson, ya que con ellos se puede monitorizar la funcionalidad de los terminales presinápticos estudiando los niveles de

dopamina o la actividad de DAT, VMAT2 o AADC (Marek et al., 2001; Morrish et al., 1998; Pavese and Brooks, 2009).

El marcaje de las células (previo a su trasplante) con un agente de contraste para IRM, permitiría la identificación de las células en el animal vivo y la utilización de las técnicas de PET y SPECT para el estudio y seguimiento de la evolución (tanto anatómica como funcional) de las células trasplantadas, ampliando así su uso hasta ahora asociado a el diagnóstico y el seguimiento de la enfermedad (ver figura 8).

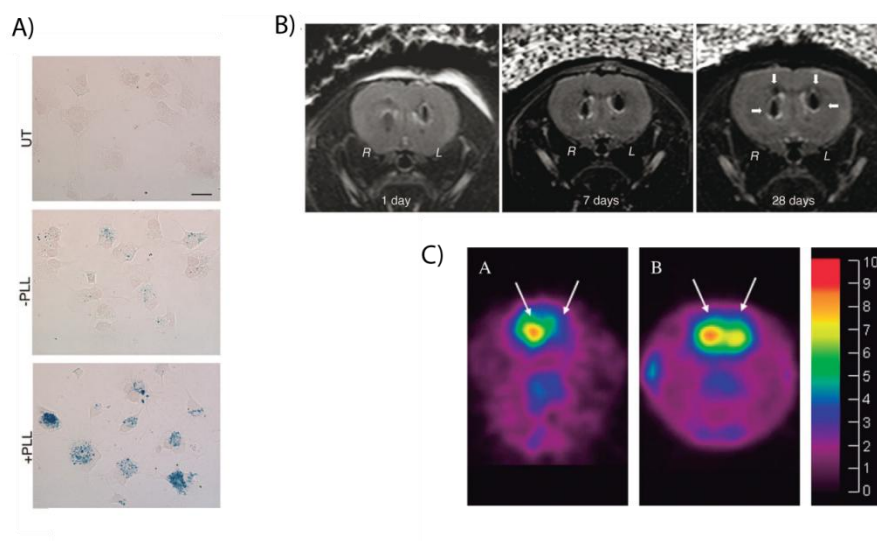


Fig. 8. A) Visualización de hNSC marcadas con SPIO mediante tinción de azul de Prusia. Para mostrar la diferencia existente entre cultivos sin marcar (*untransfected*, UT), marcados con SPIO (Sinerem, 25 μ gFe/ml, PLL-) o SPIO tratadas previamente con PLL (PLL+), cultivos bajo estas tres condiciones fueron fijados y teñidos mediante la técnica de azul de Prusia 72h después de la incubación. Como se aprecia en la imagen, las nanopartículas pueden ser identificadas fácilmente en el interior de las células tanto en la condición -PLL como +PLL. El tratamiento de este tipo de nanopartícula con PLL, incrementa el número de células marcadas y la cantidad de partículas que se incorporan al interior celular. Modificado de Neri et al., 2008.

B) Seguimiento longitudinal de trasplantes de hNSC+SPIO en el cerebro de roedor mediante IRM. La figura muestra una sección coronal del cerebro de un ratón adulto trasplantado en el hemisferio derecho con hNSC marcadas con SPIO y en el izquierdo (L) con SPIO+PLL tras 1, 7 y 28 días después del trasplante. Las imágenes fueron tomadas en T2*, apareciendo las células trasplantadas como áreas hipointensas (flechas). Modificado de Neri et al., 2008.

C) Imágenes de PET con ^{11}C -DTBZ en modelos de lesión con 6-OHDA en rata. Muestran la suma de los estudios realizados con este trazador, donde las flechas indican la posición de los estriados. En el panel a) podemos ver una rata sometida a una lesión total en el estriado derecho donde sólo se observa captación de ^{11}C DTBZ en el estriado sano. El panel b) muestra la imagen perteneciente a otro animal con una lesión parcial en lugar de total del sistema nigroestriatal, lo que da lugar a una disminución de la captación del trazador en el hemisferio lesionado sin que su señal llegue a desaparecer. Modificado de Collantes et al., 2008.

En este contexto, las partículas superparamagnéticas de óxido de hierro (SPIO) son un agente de contraste biocompatible detectable por IRM en T2* (Bulte and Kraitchman, 2004; Weissleder et al., 1989). Para que células no fagocíticas como ESC o NSC incorporen eficientemente las SPIO, estas han de ser modificadas por ejemplo añadiendo una cobertura

de dextrano que facilite su internalización y disminuya el número de partículas que quedan adheridas a la membrana plasmática (Bulte et al., 2004). Además, su tratamiento previo con agentes de transfección como la L-polilisina o la protamina, dotan a las partículas de una carga positiva extra que facilita su adhesión a la membrana plasmática y posterior internalización. Recientemente, ESC y NSC han sido marcadas magnéticamente utilizando SPIO cubiertas con dextrano para su estudio mediante IRM en diversos modelos de enfermedad del sistema nervioso central (Guzman et al., 2007; Neri et al., 2008). Antes de que este método pueda pasar a la clínica, hay que establecer los protocolos óptimos de marcaje para cada tipo celular utilizado en los trasplantes y estudiar los efectos que pueden ocasionar las SPIO en la viabilidad o la funcionalidad de las neuronas generadas. Hasta ahora, se ha podido determinar que las hNSC pueden incorporar nanopartículas magnéticas sin que se vea afectada su viabilidad. Tras su trasplante en modelos hemiparkinsonianos de rata, las células marcadas pueden detectarse mediante IRM hasta 1 mes después de la cirugía y se diferencian de manera similar en el microambiente del estriado lesionado a como lo harían células sin marcar (Guzman et al., 2007; Neri et al., 2008). Pocos estudios se han llevado a cabo hasta la fecha utilizando trazadores dopaminérgicos de PET o SPECT en modelos hemiparkinsonianos de roedor. Las imágenes de PET y SPECT obtenidas con radioligandos como ^{18}F -dopa (integridad de los terminales dopaminérgicos), ^{11}C -CFT y ^{11}C -RTI-32, ^{123}I - β -CIT, ^{123}I -FP-CIT, ^{123}I -altropan o $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -TRODAT-1 (marcadores de DAT) han servido para establecer las condiciones óptimas de adquisición de imágenes y determinar que es posible utilizar esta técnica para detectar las diferencias existentes entre el hemisferio con el sistema nigroestriatal lesionado y el intacto (Collantes et al., 2008; Forsback et al., 2004; Sanchez-Pernaute et al., 2004; Sossi et al., 2007; Topping et al., 2010). La combinación de las imágenes obtenidas mediante IRM y PET o SPECT permitiría identificar células marcadas magnéticamente que hubiesen sido trasplantadas en el cerebro de ratas lesionadas, estudiando la estructura anatómica del cerebro del animal, la localización del trasplante, su posible migración y a su vez, analizando en paralelo y a lo largo del tiempo sin dañar al animal, la maduración funcional del trasplante, conociendo su evolución a nivel de aparición de actividad relacionada con el metabolismo dopaminérgico.

5. BCL-X_L.

I. La familia de Bcl-2

La proteína Bcl-2 (B-cell leukemia/lymphoma 2) y sus homólogos forman un grupo de proteínas destacadas por su implicación en la regulación de los mecanismos de muerte celular por apoptosis. En mamíferos hay al menos 12 proteínas en esta familia y todas tienen en común los dominios de estructura en hélice básica BH. Las proteínas pertenecientes a la familia Bcl-2 se clasifican en dos grupos según su función sea anti o pro apoptótica. Dentro del grupo de proteínas pro-apoptóticas encontramos el sub-grupo de la familia de Bax (Bax y Bak) y el de las proteínas llamada BH3-only (Bid, Bad, Bim, Bmf, Bik, Puma, Noxa). El grupo de las proteínas anti-apoptóticas incluye las proteínas Bcl-X_L, Bcl-w, Bcl-2 y Mcl1. Ambos subgrupos son necesarios para el inicio de la apoptosis. La decisión de vida o muerte de una célula es consecuencia del balance entre la actividad de estas proteínas (Polster et al., 2001). Las proteínas pro y anti-apoptóticas establecen complejos por ejemplo entre Bcl-X_L y Bad, Bim o Puma, modulando así su función de manera recíproca. La heterodimerización entre moléculas pro o anti-apoptóticas puede neutralizar las actividades de una u otra, sugiriendo que las concentraciones relativas de un grupo u otro influye en la susceptibilidad de las células hacia una vía de supervivencia o muerte (Oltvai et al., 1993; Schmitt et al., 2007; Sedlak et al., 1995).

II. Papel de Bcl-X_L.

Bcl-X_L (Bcl2-like 1) es el homólogo más cercano a Bcl-2 y es un potente inhibidor del mecanismo de apoptosis inducido por insultos citotóxicos. Su dominio C-terminal hidrofóbico (o TM, de dominio transmembrana) le permite dirigirse e integrarse (en determinados casos) en la parte citosólica de la membrana mitocondrial (membrana externa), del retículo endoplásmico y de la envuelta nuclear (Zamzami et al., 1998). La función de Bcl-X_L ha sido ampliamente estudiada a nivel de su papel anti-apoptótico (Boise et al., 1993). Una de sus funciones principales es inhibir la oligomerización de las proteínas pro-apoptóticas Bax y Bak, impidiendo la permeabilización de la membrana mitocondrial y la liberación de moléculas inductoras de muerte celular como el citocromo c, AIF (apoptosis inducing factor), smac/diablo (second mitochondria-derived activator of caspase/ direct IAP binding protein with low pI), Omi/HtrA2 (Omi stress-regulated endoprotease/high temperature requirement A serine peptidase 2) y endoG (endonuclease G) vía VDAC (Voltaje-dependent anion channel) y la consiguiente activación de la cascada de caspasas que conllevaría la ejecución de la muerte celular.

Además de su importancia en la regulación de la muerte celular, la familia Bcl-2 ha sido relacionada con la progresión del ciclo celular. En particular, la sobre-expresión de Bcl-2 o Bcl-X_L ha sido asociada con el paro en fase G1 del ciclo celular (mediante la modulación de p27^{KIP1} (Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B)), inhibiendo de la re-entrada en el ciclo celular (Zinkel et al., 2006) y promoviendo así la senescencia celular en respuesta a un tumor (Chen et al., 2000; Kim, 2005).

Los miembros de la familia de Bcl-2 también están implicados en funciones esenciales desde la embriogénesis temprana hasta la homeostasis tisular en los individuos adultos. En particular, diversos estudios realizados en ratón han permitido determinar que el gen Bcl-X_L se expresa en diversas regiones del cerebro. Se ha visto que su expresión es imprescindible para la supervivencia de las neuronas inmaduras durante el desarrollo del sistema nervioso central, y en particular para el desarrollo de las neuronas catecolaminérgicas de la sustancia negra (Gonzalez-Garcia et al., 1995; Hon et al., 2004; Krajewska et al., 2002; Mizuguchi et al., 1996; Savitt et al., 2005). Varios estudios mostraron que la sobre-expresión específica de Bcl-2 en neuronas dopaminérgicas resulta en una protección de estas células frente a las neurotoxinas 6-OHDA o MPTP *in vitro* e *in vivo*, pero también en una protección frente a la muerte natural neuronal que transcurre durante el desarrollo del sistema nervioso (Farlie et al., 1995; Offen et al., 1998; Yang et al., 1998). De la misma forma, Bcl-X_L demostró ejercer un efecto neuro-protector para las neuronas dopaminérgicas expuestas a 6-OHDA en modelos *in vitro* inhibiendo la liberación de citocromo c desde la mitocondria y la activación de la proteína caspasa-3 (Jordan et al., 2004; Nicholson, 1999; Nicholson and Thornberry, 1997). *In vivo*, la eficacia neuroprotectora de Bcl-X_L fue establecida mediante el uso de proteínas de fusión Tat-Bcl-X_L capaces de atravesar la barrera hemato-encefálica y las membranas biológicas, llegando hasta la sustancia negra e impidiendo la degeneración de las neuronas dopaminérgicas tras la inyección de MPTP (Cao et al., 2002; Dietz et al., 2008).

En los últimos años se han identificados otras funciones para Bcl-X_L independientes de su papel anti-apoptótico. A partir de dos estudios independientes de sobre-expresión de esta proteína (Chang et al., 2007; Liste et al., 2007), se han podido identificar dichos efectos. Liste y colaboradores determinaron que la sobre-expresión de Bcl-X_L en células troncales neurales humanas derivadas de cerebro anterior promovía su diferenciación hacia un fenotipo neuronal en decremento del glial (Liste et al., 2007). A su vez, Chang et al confirmaron dichos resultados en precursores corticales de ratón sobre-expresando Bcl-X_L. La delección de Bax (en modelos de ratones transgénicos o en modelos celulares) permitió obtener resultados similares, concluyendo que Bax y Bcl-X_L constituyen elementos claves en la especificación neuronal y glial

de las células troncales neurales (Chang et al., 2007). Sin embargo, los mecanismos a través de los cuales ocurre este favorecimiento hacia un compromiso neuronal continúan sin conocerse.

6. RESULTADOS PREVIOS.

Ver figuras en Anexo I.

Estudios anteriores y paralelos a la realización de esta tesis doctoral llevados a cabo por las Doctoras Isabel Liste, Ana Villa y Elise Courtois resultaron en la generación y caracterización de dos líneas celulares humanas immortalizadas derivada de la región del mesencéfalo ventral a partir de fetos abortados de 10 semanas de gestación, cuyo estudio en profundidad será el objeto de esta tesis doctoral. Brevemente podemos decir que, una vez disgregado el tejido y generada una suspensión celular a partir de la región del mesencéfalo ventral, las células obtenidas fueron immortalizadas mediante la infección con un vector retroviral codificante para *v-myc* (LTR-vmc-SV40p-Neo-LTR) (Villa et al., 2000) generando la línea policlonal **hVM1** (Villa et al., 2009). Combinando la propagación genética (*v-myc*) con la epigenética (medio de proliferación suplementado con mitógenos EGF y bFGF) se procedió a la expansión y caracterización "*in vitro*" de esta línea celular. Cuando se analizaron marcadores de células madre no diferenciadas y para células neurales en diferenciación se encontró que (Anexo I, figura 1):

- En los cultivos en proliferación casi todas las células eran positivas para Nestina ($96,85 \pm 2,25$) y Vimentina ($92,77 \pm 1,3\%$), marcadores de progenitores del neuroepitelio y de células madre, y algunas de estas células no diferenciadas ($22,6 \pm 1,5$) eran positivas para el marcador de glía radial 3CB2.
- En los cultivos en diferenciación (7d) se analizaron diversos marcadores para identificar los tres principales linajes de las células neurales:
 1. astrocitos : $20,18 \pm 2,48\%$ de células GFAP positivas
 2. neuronas: el $26,14 \pm 3,41$ del total de células fueron positivas para β -III-Tubulina (marcador de neuronas tempranas) y el $20,6 \pm 1,8\%$ para MAP-2 (marcador de neuronas maduras)
 3. oligodendrocitos: algunas células fueron positivas para Ng2 ($7,53 \pm 1,23\%$) un marcador de los progenitores de oligodendrocitos y únicamente se encontró alguna célula ocasional marcada para MBP (oligodendrocitos maduros) cuando las células se diferenciaron 17 días.

Todo esto demostró que la línea celular hVM1 podía ser expandida “*in vitro*” manteniendo su multipotencialidad, característica de las células troncales neurales.

La población neuronal generada tras 7d de diferenciación fue analizada para determinar la cantidad de neuronas dopaminérgicas presentes en los cultivos, obteniéndose que un $12,25 \pm 0,42\%$ del total de células eran positivas para TH, lo que representa aproximadamente la mitad del total de neuronas β -III-Tubulina ($45,51 \pm 4,33\%$) del cultivo (Anexo I, figura 2). Estas células TH positivas eran también inmunoreactivas para diversos marcadores de mesencéfalo ventral y Substancia Nigra pars compacta, como Girk2 y Pitx3, y también eran capaces de producir y liberar dopamina (Anexo I, figura 3). Además, se confirmó que la línea hVM1 era capaz de generar otros subtipos neuronales típicos de la región del mesencéfalo ventral, como neuronas gabaérgicas y glutamatérgicas (Anexo I, figura 4).

Sin embargo, y al igual que se ha descrito en otras líneas derivadas de mesencéfalo ventral cultivadas en forma de neuroesferas (Jensen and Parmar, 2006), con el tiempo y los pases en cultivo se observó una drástica disminución en el número de células β -III-Tubulina y TH positivas a partir del pase 11, no superando ninguna de ellas el 1% del total de células del cultivo a pase 31 (Courtois et al.; Courtois et al., 2010) (Anexo I, figura 5). Basándonos en estudios previos realizados con células humanas de origen fetal derivadas de cerebro anterior en las cuales la expresión forzada de Bcl-X_L se asoció con un incremento en el número de progenitores neuronales frente a gliales y específicamente con una inducción de neuronas dopaminérgicas generadas *in vitro* (Liste et al., 2007; Liste et al., 2004), se comprobó la eficiencia de la expresión forzada de Bcl-X_L en la línea hVM1. La línea policlonal hVM1 fue infectada a pase 6 (Anexo I, ver figura 6) con vectores retrovirales codificantes para Bcl-X_L y rhGFP (LTR-Bcl-X_L-IRES-rhGFP-LTR) o una secuencia control vacía con rhGFP (LTR- \emptyset -IRES-rhGFP-LTR). Finalmente, se obtuvieron las líneas policlonales con transfección estable **hVM1- \emptyset** y **hVM1 high Bcl-X_L** (Courtois et al., 2010). Una vez determinado que la introducción del vector vacío no tenía ningún efecto a nivel de diferenciación multipotencial de las células hVM1- \emptyset al compararlas con las hVM1, se procedió a continuar con la caracterización de las células hVM1 high Bcl-X_L.

Las sublínea hVM1 high Bcl-X_L generada era capaz de mantener la multipotencialidad, presentando marcadores de progenitores neurales (Nestina y Vimentina) en proliferación y dando lugar a neuronas (β -III-Tubulina), astroglia (GFAP) y oligodendrocitos (Ng2) tras 7d de diferenciación (Anexo I, figura 7). Los resultados mostraron que Bcl-X_L era capaz de recuperar y/o mantener la generación de neuronas y células TH positivas cuando las células se mantenían largos periodos en cultivo (expandidas hasta pase 36) (Tesis Dr. Elise Courtois,

2008) (Courtois et al., 2010). Tras la introducción de Bcl-X_L el porcentaje de neuronas que generaba el cultivo a pase alto era de un 25% (β -III-Tubulina) y concretamente el de neuronas dopaminérgicas (TH⁺) alcanzaba el 18%. Además, las células hVM1 high Bcl-X_L diferenciadas 7d y caracterizadas a pase alto (25-30) mantenían la expresión de proteínas relacionadas con el sistema dopaminérgico (Girk2, Pitx3) y eran capaces de sintetizar y liberar dopamina al medio extracelular en cultivo (Anexo I, ver figura 8).

ANEXO I

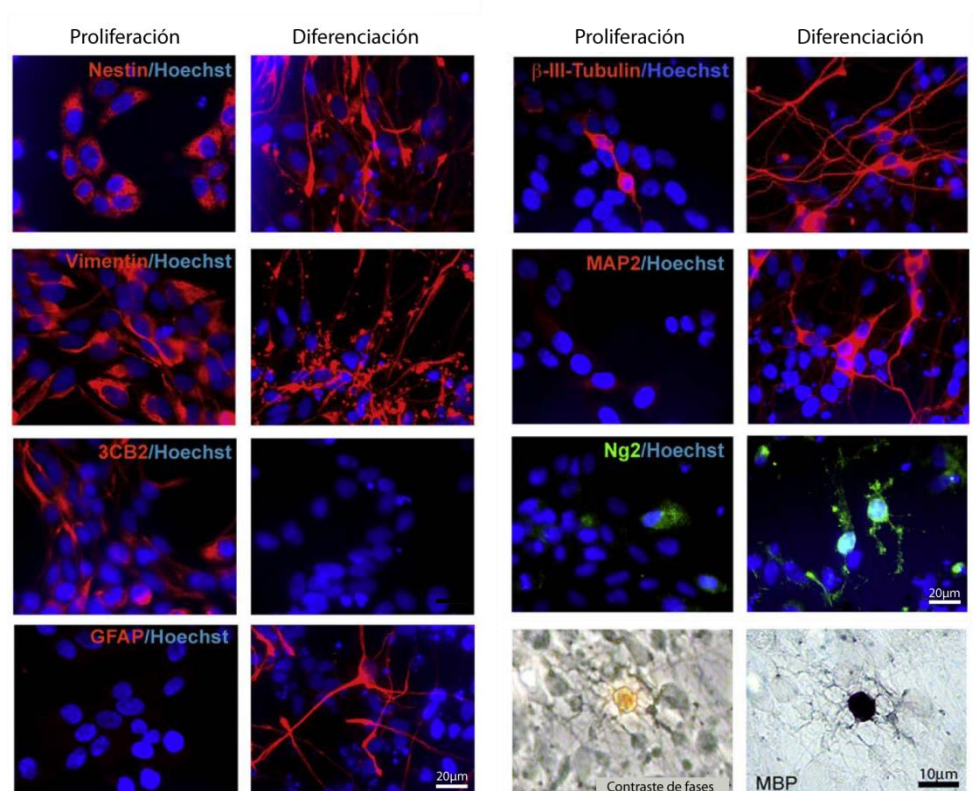


Fig. 1. Propiedades fenotípicas de la línea hVM1 en división (en presencia de bFGF y EGF en el medio de cultivo) y después de 7 días de diferenciación en medio sin mitógenos suplementado con dbAMPc y GDNF.

Las imágenes de inmunofluorescencia muestran como las células hVM1 son positivas para marcadores como Nestina, Vimentina, 3CB2, β -III-Tubulina, MAP2 y Ng2. Las células positivas se visualizan en rojo (Cy3) o verde (A488) y los núcleos han sido teñidos en azul con Hoechst. La mayoría de las células son positivas para Nestina y Vimentina durante la proliferación. Tras la diferenciación de los cultivos, las células hVM1 expresan proteínas características de neuronas maduras (MAP2), de glía radial (GFAP) y progenitores de oligodendrocitos (Ng2). Además, en contraste de fases podemos ver que algunas células son también positivas para el marcador de oligodendrocitos MBP cuando los cultivos se diferencian hasta los 17 días.

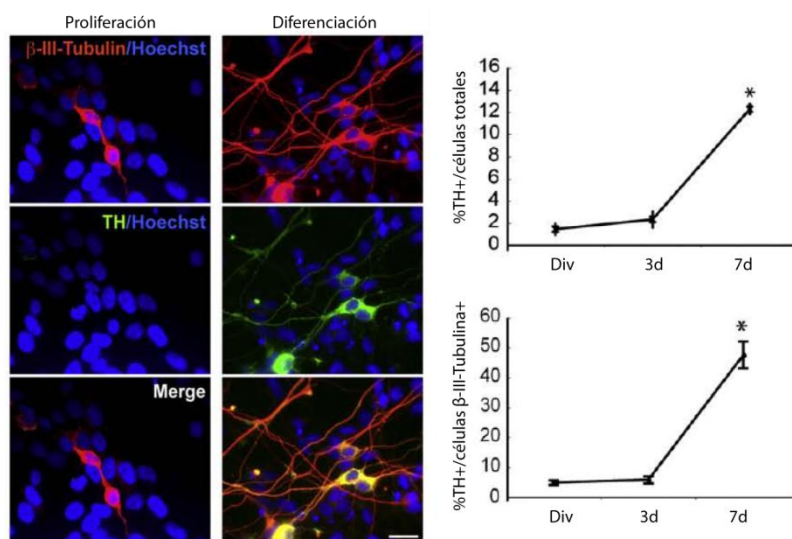


Fig. 2. Análisis mediante inmunocitoquímica de las células β -III-Tubulina (rojo) y TH (verde) generadas a partir de cultivos de células hVM1 en división y en diferenciación (3 y 7d) en medio Lotharius.

Los núcleos se visualizan en azul ya que han sido tratados con Hoechst. El porcentaje de células TH+ respecto del total de células del cultivo y de TH+ respecto del número total de neuronas ($\text{TH}^+/\beta\text{-III-Tubulina}^+$) se determinó bajo condiciones de proliferación y diferenciación estándar. Los datos se obtuvieron de experimentos realizados por

triplicado, en los que se contaron al menos 5 campos por cubre, y se expresan como la media \pm ESM (* $p < 0,05$, ANOVA, Tukey test). Barra de escala=20 μm .

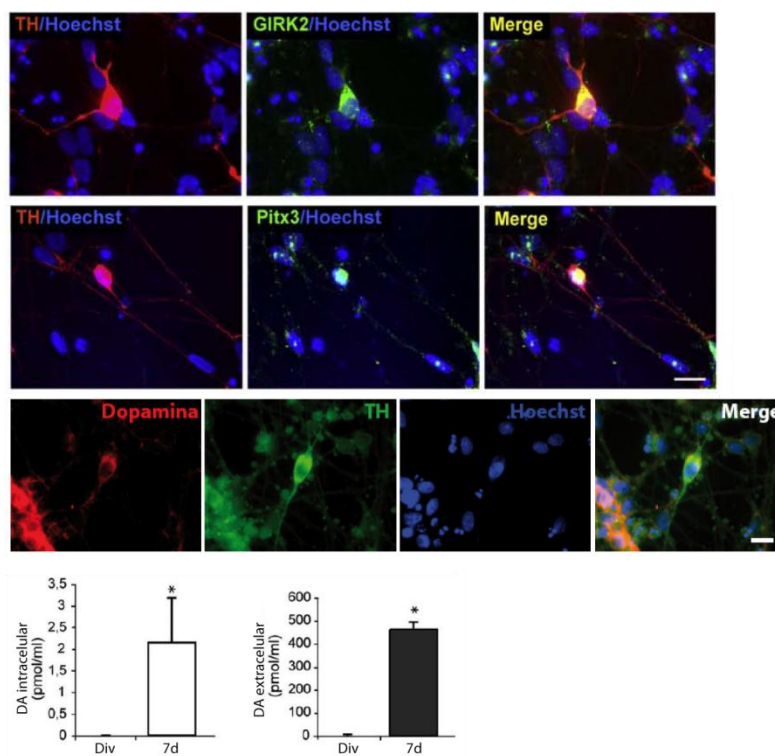


Fig. 3. Estudio de las neuronas TH⁺.

Imágenes de inmunocitoquímica mostrando la co-localización de TH en las células hVM1 diferenciadas 7d con otros marcadores genuinos de las neuronas dopaminérgicas de mesencéfalo ventral como: GIRK2, Pitx3 y dopamina. Los núcleos se visualizan en azul ya que han sido tratados con Hoechst. Barra de escala=20μm. Además, se muestran los resultados de la medida de dopamina intracelular (extractos celulares) y extracelular (sobrenadantes) detectada mediante HPLC en los cultivos en estado de proliferación y tras 7d de diferenciación. Los datos se obtuvieron de experimentos realizados por triplicado y se expresan como la media ± ESM (*p<0,05, t-test).

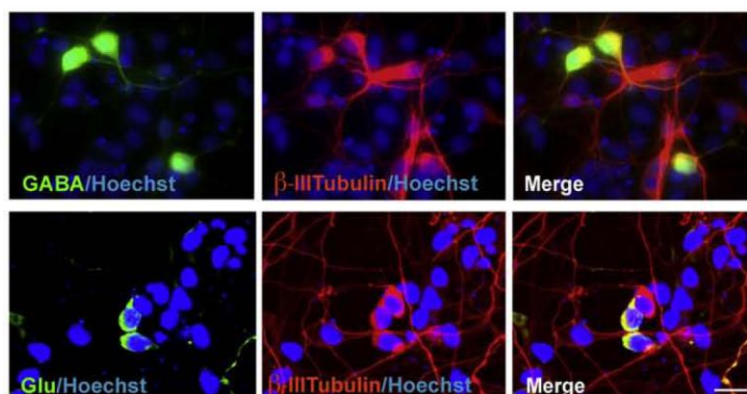


Fig. 4. Análisis fenotípico de las neuronas TH⁺.

En los cultivos diferenciados 7d de las células hVM1 podemos encontrar neuronas (células β-III-Tubulina⁺) con un fenotipo distinto del dopaminérgico, ya que son positivas para otros neurotransmisores como GABA y glutamato (Glu). Los núcleos se visualizan en azul ya que han sido tratados con Hoechst. Barra de escala=20μm.

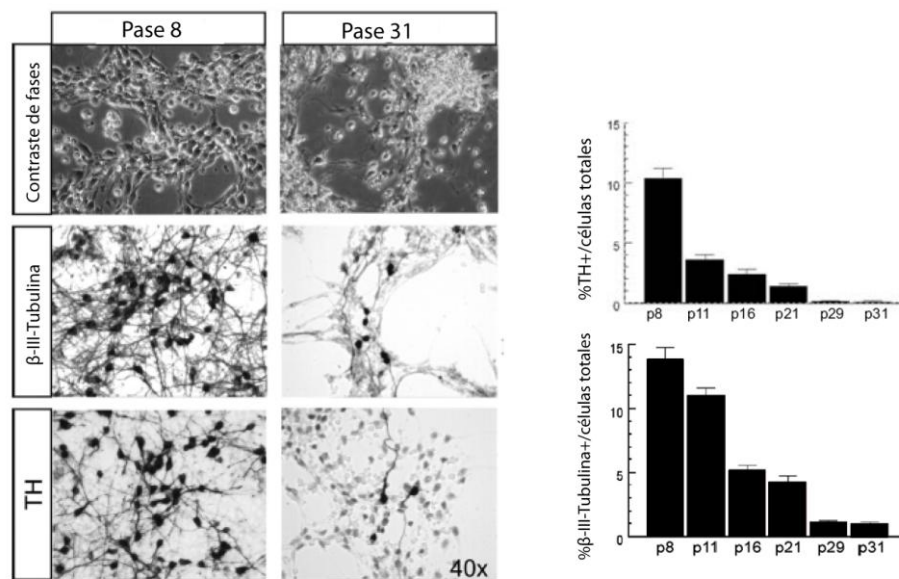


Fig. 5. Efecto de la expansión prolongada *in vitro* de las células hVM1 sobre su capacidad neurogénica.

Fotografías en contraste de fases de células hVM1 de pase bajo (8) y alto (31, más de un año en cultivo) teñidas para el marcador neuronal β -III-Tubulina y el dopaminérgico TH tras 7d de diferenciación. Una vez calculados los porcentajes de células β -III-Tubulina⁺ y TH⁺ respecto del número total de células presentes en estos cultivos, podemos afirmar que el número de neuronas, y de neuronas dopaminérgicas específicamente, desciende según aumenta el número de pase y el tiempo de cultivo *in vitro*. Los datos representan el valor medio \pm ESM de los conteos realizados para condición por triplicado, teniendo en cuenta al menos 5 campos por cubre.

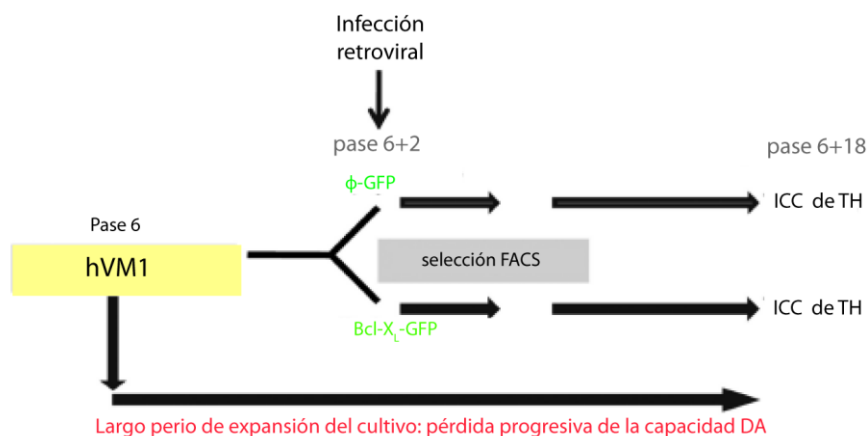


Fig. 6. Esquema mostrando el procedimiento experimental realizado para la sobre-expresión de Bcl-X_L en la línea celular hVM1 a pase bajo.

Los cultivos hVM1 a pase6 fueron infectados con un vector retroviral vacío-GFP o codificante para Bcl-X_L (Bcl-X_L+GFP). Tras seleccionar mediante FACS las células infectadas correctamente, se obtuvieron dos líneas celulares (hVM1 ϕ -GFP y hVM1 high Bcl-X_L) que fueron expandidas más de 12 pases y analizadas para ver el porcentaje de neuronas y células TH⁺ que generaban.

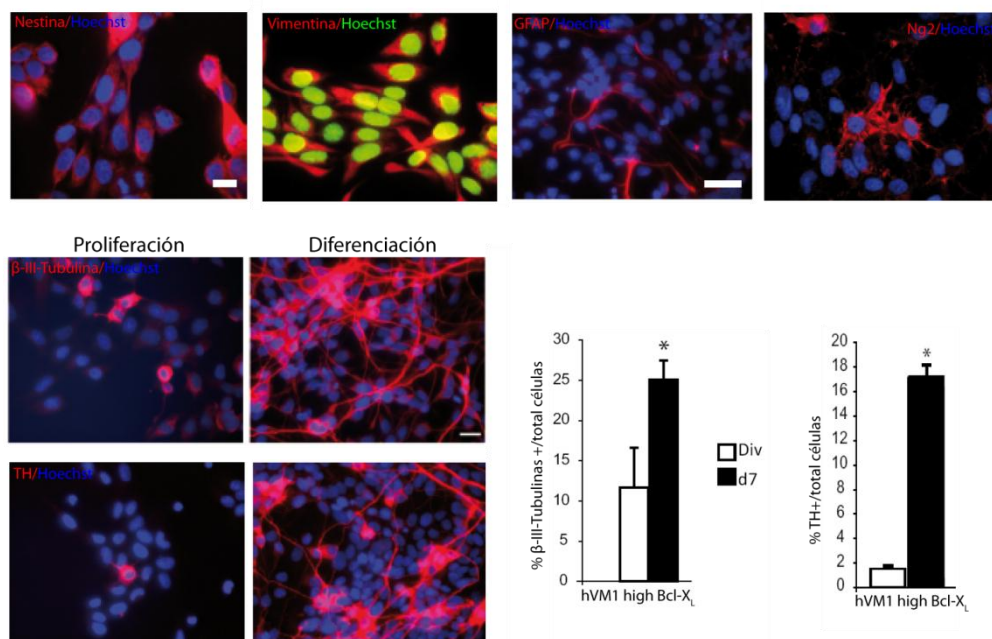


Fig. 7. La línea celular hVM1 high Bcl-X_L mantiene la pluripotencialidad observada en hVM1.

A pase 20-25 expresan marcadores de troncalidad (Nestina y Vimentina) en condiciones de proliferación y al diferenciar 7d son positivas para GFAP (marcador de glía radial), Ng2 (oligodendrocitos) y β-III-Tubulina (neuronas). Tras 7d de diferenciación el porcentaje de neuronas y células TH⁺ frente a células totales se mantiene elevado, por lo que tras la sobre-expresión de Bcl-X_L la línea hVM1 mantiene su capacidad neurogénica incluso a pases elevados. Los datos representan la media ± ESM (*p<0,05, ANOVA, Tukey test) con n=3. Barra de escala =10 y 20μm.

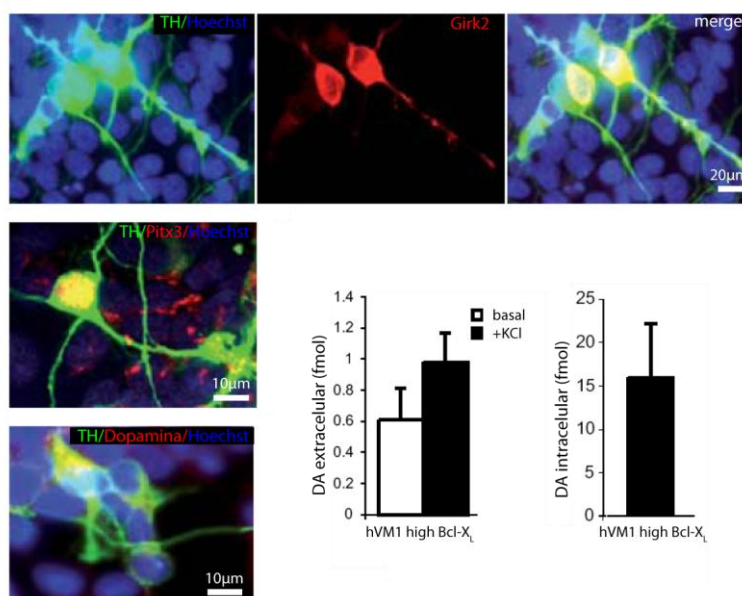


Fig. 8. Estudio de las neuronas TH⁺ generadas en la línea celular hVM1 high Bcl-X_L.

Imágenes de inmunocitoquímica mostrando la co-localización de TH en las células hVM1 diferenciadas 7d con otros marcadores genuinos de las neuronas dopaminérgicas de mesencéfalo ventral como: GIRK2, Pitx3 y dopamina. Los núcleos se visualizan en azul ya que han sido tratados con Hoechst. Además, se muestran los resultados de la medida de dopamina extracelular (sobrenadantes) e intracelular (extractos celulares) detectada mediante HPLC en los cultivos tras 7d de diferenciación. Los datos se obtuvieron de experimentos realizados por triplicado y se expresan como la media ± ESM.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Caracterización en profundidad de las líneas hVM1 y hVM1 high Bcl-X_L cultivadas *in vitro* para determinar el patrón de expresión de genes y proteínas importantes en la generación y el desarrollo correcto de las neuronas dopaminérgicas del grupo A9.

Estudio de la presencia en los cultivos celulares generados a partir de las líneas hVM1 y hVM1 high Bcl-X_L de otros fenotipos neuronales distintos del dopaminérgico, importantes en el sistema nigroestriatal. Además, se determinará la presencia de los neurotransmisores y receptores necesarios para el tráfico correcto de información en el circuito de los ganglios basales, los cuales deberían estar presentes en una fuente de neuronas dopaminérgicas apta para su utilización en terapias de reemplazamiento celular.

Estudio del grado de maduración y funcionalidad adquirido en cultivos de células hVM1 y hVM1 high Bcl-X_L tras un periodo largo (30 días) de diferenciación *in vitro*.

Estudio del papel de Bcl-X_L durante los primeros días de diferenciación de estos cultivos para esclarecer los posibles mecanismos a partir de los cuales su expresión forzada previene de la pérdida de la capacidad neurogénica observada en la línea hVM1 tras más de 14 pases en cultivo.

Establecer un protocolo óptimo de marcaje con nanopartículas superparamagnéticas de hierro en la línea celular hVM1 high Bcl-X_L, que no altere la viabilidad ni las propiedades de estas células y que permita su seguimiento mediante IRM tras su trasplante en un modelo hemiparkinsoniano de roedor.

Puesta a punto del marcaje de neuronas dopaminérgicas maduras utilizando radiotrazadores detectables mediante PET y/o SPECT relacionados con el sistema dopaminérgico y su detección posterior en animales hemiparkinsonianos.

Determinar la posibilidad de combinar imágenes obtenidas mediante IRM y PET/SPECT. En animales hemiparkinsonianos trasplantados con células marcadas con nanopartículas superparamagnéticas de hierro, la combinación de las imágenes de IRM (localización de las células trasplantadas) con las de PET/SPECT (funcionalidad del trasplante) nos permitiría conocer la evolución del trasplante a nivel de integración y funcionalidad de manera no invasiva, a lo largo del tiempo en un mismo animal.

*MATERIALES Y
MÉTODOS*

MATERIALES Y MÉTODOS

1. CULTIVOS CELULARES

I. Generación y Cultivo de células humanas de mesencéfalo ventral

El aislamiento y la generación e inmortalización de las líneas celulares utilizadas en este trabajo fue previamente descrito por (Courtois et al.; Courtois et al., 2010; Villa et al., 2009). Brevemente, las células humanas de mesencéfalo ventral fueron aisladas de la región de cerebro medio de fetos abortados a 10 semanas de gestación en el Hospital Universitario de Lund (Suecia) cumpliéndose las directrices de la UE, declaración de Helsinki, recomendaciones éticas de la Red Europea de Trasplantes (NECTAR) y la ley RD 42/1988 española (vigente en el momento de llevar a cabo aquel trabajo). Todos los procedimientos se hicieron acorde con las recomendaciones de la Sociedad de Neurociencia (SfN) y aprobados por el Comité de Ética de la Investigación de la Universidad Autónoma de Madrid (España). Una vez disgregado el tejido y obtenida una suspensión celular, las células fueron inmortalizadas mediante la infección con un vector retroviral codificante para *v-myc* (LTR-vmyc-SV40p-Neo-LTR) (Villa et al., 2000) generando la línea policlonal **hVM1** (Villa et al., 2009). De acuerdo con resultados previos obtenidos en el laboratorio trabajando con células derivadas de cerebro anterior (Liste et al., 2007; Liste et al., 2004), se procedió a la generación de una línea estable que sobre-expresase Bcl-X_L derivada de mesencéfalo ventral. La línea policlonal hVM1 fue infectada a pase 6 con vectores retrovirales codificantes para Bcl-X_L y rhGFP (LTR-Bcl-X_L-IRES-rhGFP-LTR) o con una secuencia control vacía con rhGFP (LTR- \emptyset -IRES-rhGFP-LTR) a una multiplicidad de infección de una partícula por célula. Las células infectadas fueron seleccionadas mediante FACS (*fluorescence activated cell sorting*) (FACSCalibur, BD Biosciences) utilizando la expresión de GFP. Finalmente, se obtuvieron tres líneas policlonales con transfección estable: **hVM1- \emptyset** , **hVM1 low Bcl-X_L** y **hVM1 high Bcl-X_L** (indicando expresión baja y alta de GFP respectivamente y que se corresponde también con valores altos o bajos de niveles de Bcl-X_L). En el presente estudio nos centraremos en las líneas celulares hVM1, hVM1- \emptyset y hVM1 high Bcl-X_L.

Las células se mantienen bajo condiciones proliferativas en medio HSC (*Human Stem Cells*) descrito en (Villa et al., 2000) que es un medio definido químicamente, sin suero, compuesto por: DMEM/F12 (Gibco) en proporción 1:1 con Glutamax I (Gibco), 20% Albumax (Gibco), 5nM Hepes (Gibco), 30% Glucosa (Sigma), 1x suplemento N2 (Gibco), 1x aminoácidos no esenciales, una mezcla de antibióticos penicilina/estreptomicina (100u/mlP/100µg/mlE)) suplementado con hr-EGF (*human recombinant Epidermal Growth Factor*) y hr-bFGF (*human recombinant basic Fibroblast Growth Factor*) (20ng/ml cada uno, Research & Development Systems). Durante la proliferación las células son pasadas mediante tripsinización cada 2-3 días.

Para inducir la diferenciación celular, se retiran del medio los factores de crecimiento (EGF y bFGF) y se añaden al medio HSC hr-GDNF 2ng/ml (*human recombinant Glial Derived Neurotrophic Factor*, Peprotech) y dibutilil-AMPc 1mM (Sigma)(Lotharius et al., 2002).

Durante la proliferación y expansión, las células son cultivadas en placas de plástico recubiertas con poli-L-lisina (PLL, 10µg/ml, Sigma) adheridas formando una monocapa. Para su diferenciación las células son sembradas a una densidad de 10^5 células/cm² en placas de plástico tratadas con 10µg/ml PLL o sobre cubres de cristal recubiertos con 25 µg/ml PLL.

Para diferenciaciones más largas de 7 días las placas y cubres cristal son tratados adicionalmente con 1 µg/ml laminina (Sigma).

Una vez sembradas las células para su diferenciación, se mantiene el medio de proliferación durante 24h antes de su cambio a medio de diferenciación (día 0). Durante la diferenciación 2/3 del medio es renovado 3 veces a la semana.

Todos los cultivos (proliferación y diferenciación) se realizan a 37°C y un 95% de humedad en una atmósfera de bajo oxígeno (5% O₂) y 5%CO₂ en un incubador dual CO₂-O₂ (Forma).

II. Cultivos primarios de mesencéfalo ventral de ratón

Los cultivos primarios fueron preparados a partir de embriones E12-E14.5 de ratonas gestantes C57B/L6. Los experimentos se llevaron a cabo siguiendo las directrices del Consejo de la Unión Europea (86/609/EU), la normativa española (BOE 67/8508-12), las recomendaciones de la Sociedad de Neurociencia y fueron aprobados por el Comité de Ética en la Investigación de la Universidad Autónoma de Madrid (España).

La fecha de aparición del tapón vaginal fue identificada como E0 (día embrionario 0). Las ratonas gestantes fueron sacrificadas mediante dislocación cervical, procediéndose seguidamente a la extracción de los sacos embrionarios, que fueron mantenidos en PBS frío suplementado con 6mM glucosa y 1% BSA durante el procedimiento. Bajo condiciones

asépticas los embriones son extraídos y la cabeza es separada del resto del cuerpo. A continuación y bajo una lupa (Lupa MZ6, Leica) se retiran la piel, el cartílago, los vasos sanguíneos y las meninges. Una vez obtenido el cerebro la región del pliegue mesencefálico es identificada, se eliminan la región anterior y posterior, y se separa la región mesencefálica dorsal de la ventral. La región del mesencéfalo ventral recogida de todos los embriones es colocada en un tubo de 1,5 ml y resuspendida en PBS suplementado con 6mM glucosa y 1% BSA. El tejido es disgregado enzimáticamente mediante su incubación con papaína (0,01%, 20U/ml, Sigma) y DNasa I 10mg/ml (Sigma) durante 5min a 37°C. Posteriormente, es disgregado mecánicamente en una suspensión celular utilizando pipetas Pasteur de vidrio estériles con tamaños de poro decrecientes. La suspensión celular es centrifugada 5 min a 900rpm y el *pellet* se resuspende en medio Neurobasal (Gibco) suplementado con B27 (Gibco) y glutamina 500μM (Gibco), una mezcla de antibióticos penicilina/estreptomicina (100u/mlP/100μg/mlE) y 50% FCS (*fetal calf serum*, inactivado por calor, Gibco). Los cultivos primarios son sembrados a una densidad de 200.000 células/pocillo de placas P24 (2cm²) con cubres de cristal previamente tratados con poli-L-lisina 25μg/ml y laminina 1μg/ml (Sigma). A las 4h de la siembra, el medio es remplazado por Neurobasal (Gibco) suplementado con B27 (Gibco) y glutamina 500μM (Gibco), con una mezcla de antibióticos penicilina/estreptomicina (100u/mlP/100μg/mlE) sin suero. Las células son incubadas a 37°C y un 95% de humedad en una atmósfera de bajo oxígeno (5% O₂) y 5%CO₂ en un incubador dual CO₂-O₂ (Forma).

2. ESTUDIO DE MICROARRAYS DE ADN

I. Preparación de las muestras celulares y aislamiento del ARN

Se cultivaron células hVM1 de pase bajo (10) y alto (35) y células hVM1 high Bcl-X_L de pase bajo (15) y alto (35) en placas P60 en condiciones de diferenciación durante 4 días. Cada tipo celular se sembró por triplicado. Para la extracción del ARN total las células fueron lavadas con medio HSC (sin suplementos) y PBS y posteriormente tripsinizadas.

El ARN fue obtenido a partir de cultivos celulares con una densidad de 2-3 millones células/placa utilizando el *High Pure RNA isolation kit* (Roche). La extracción se realizó mediante lisis celular, inactivación de las RNasas citosólicas y unión selectiva del ARN total a la columna de extracción gracias a la presencia de HCl - guanidina. Finalmente, la aplicación de

una solución con bajas concentraciones de sales liberó el RNA de la columna de extracción. Su concentración fue determinada midiendo la absorbancia (A_{260}/A_{280}) de 1µl ARN total en el Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific) y la calidad de las muestras se evaluó mediante electroferograma en el Bioanalizador Agilent 2100.

II. Síntesis del cARN biotinilado

A partir de 5 µg de ARN total los cADN de doble cadena se sintetizaron usando oligo dT-primer con un sitio promotor de la polimerasa RNA T7 añadido al extremo 3'. Estos cADN se utilizaron como molde para la transcripción *in vitro* que, mediante el *One cycle target-labelling kit* (Affymetrix, Santa Clara, CA), nos permite obtener el cARN marcado con biotina. Las preparaciones de cARN (15mg) fueron fragmentadas a 94°C durante 35min hasta 35-200 bases de longitud y se añadieron a la solución de hibridación formada por 100nmol/l ácido 4-morfolinapropanosulfónico, 1 mol/l Na⁺ y 20mmol/l de EDTA en presencia de 0,01% Tween-20 para una concentración final de cARN de 0,05mg/ml.

III. Análisis de expresión génica: hibridación, lavado y escaneo de los microarrays

Tres replicados biológicos para cada tipo de muestra fueron hibridados independientemente. Se hibridaron 10µg de cARN fragmentado al Human Genome U133 Plus 2.0 Array (Affymetrix), el cual contiene más de 47000 transcritos y variantes e incluye 38000 genes humanos bien caracterizados. Cada muestra fue añadida a una solución de hibridación compuesta por 100mM ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico, 1 M Na⁺ y 20mM de EDTA en presencia de 0,01% Tween-20 para una concentración final de cARN de 0,05µg/ml. La hibridación se realizó durante 16h a 45°C. Cada microarray fue lavado y teñido con estreptavidina-ficoeritrina en una estación Fluidics 450 (Affymetrix) y escaneado con una resolución de 1,56 µm en un sistema de escaneo GeneChip Scanner 3000 7G (Affymetrix). El análisis de datos fue realizado mediante GeneChip Operating Software (GCOS).

IV. Análisis de datos

El análisis se realizó mediante el paquete affylmaGUI (Wettenhall et al., 2006). Algoritmos robustos para *Multi-array* análisis (RMA) fueron utilizados para la corrección del fondo inespecífico, la normalización y el sumario de los niveles de expresión (Irizarry et al.,

2003). A continuación, se realizaron análisis de expresión diferencial mediante Bayes estadística-t a partir de modelos lineales para datos de microarrays (limma), incluido en el paquete affyLmaGUI. Los valores de p fueron corregidos para múltiples muestras utilizando el método de Benjamini-Hochberg (Reiner et al., 2003).

Los datos se visualizaron mediante la aplicación FIESTA on-line FIESTA viewer v1.0. (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/FIESTA/index.php>, BioinfoGP, CNB). Posteriormente se fijaron los parámetros de *fold change* y FDR (*false discovery rate*) para determinar el umbral de restricción y considerar únicamente los genes con un cambio significativo. Mediante un análisis exhaustivo, tanto manual (basado en conocimientos previos y bibliográficos) como mediante herramientas informáticas (DAVID, Functional Annotation Tool DAVID Bioinformatics Resources 2008, NIAID/NIH que permite asociar genes a procesos biológicos, celulares, moleculares o rutas proteicas concretas), se determinaron los genes de interés para futuros estudios.

3. ESTUDIOS DE Q-RT-PCR

I. Extracción del RNA y síntesis de los cADN

Las distintas líneas celulares fueron cultivadas en placas p60 a una densidad de 2-3 millones de células/placa. Para la extracción del ARN total de cultivos hVM1 y hVM1 high Bcl-X_L, tanto en división como en diferenciación, las células fueron tripsinizadas y lavadas con medio HSC (sin suplementos) y PBS.

La extracción se realizó mediante lisis celular, inactivación de las *RNasa* citosólicas y unión del RNA total selectivamente a la columna de extracción gracias a la presencia de HCl - guanidina utilizando el *High Pure RNA isolation kit* (Roche). Finalmente, la aplicación de una solución con bajas concentraciones de sales liberó el ARN de la columna de extracción.

Su concentración y pureza fue determinada midiendo la absorbancia (A260/A280) de 1µl RNA total en el Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific).

1µg de ARN fue retro-transcrito utilizando el *High capacity cDNA achieve kit* (Applied Biosystems), obteniéndose los cADNs correspondientes de cada muestra. Los componentes para un volumen final de 100µl reacción son: 1µg RNA, 10µl *reaction buffer* 10x, 10µl *random primers* 10x, 5µl dNTP's 25x (100mM), 6µl RNA polimerasa. Parámetros de la PCR: 10min. 25°C, 2h 37°C, dejar a 4°C.

II. PCR a tiempo real

La PCR a tiempo real para la cuantificación relativa fue llevada a cabo mediante un ensayo con sondas TaqMan en el equipo ABI PRISM 7900 HT y 7000 (Applied Biosystems) situado en el Parque Científico, con la colaboración del Dr. Ricardo Ramos.

Brevemente: se emplea una sonda que tiene un fluorocromo *reporter* en 5' (FAM) y un fluorocromo *quencher* en 3' (TAMRA). Cuando ambos están unidos a la sonda el *reporter* no emite señal, pero cuando la sonda hibrida con la secuencia de interés, la actividad exonucleasa de la Taq polimerasa libera el fluorocromo *reporter* emitiendo una señal fluorescente que se va acumulando en los sucesivos ciclos de PCR. Como gen control endógeno a la hora de normalizar se utilizó hGAPDH. Se analizó la expresión de los siguientes genes: *AADC*, *CHOM3*, *CHOM5*, *GABARA3*, *GABABRB1*, *GTPCH*, *OTX2*, *LMX1B*, *EN1*, *PITX3*, *NURR1 (NR4A2)*, *MSX1*, *MASH1*, *NEUROGENINA2*, *PAX6*, *TH*, *DAT (SLC6A3)*, *GIRK2 (KCNJ6)*, *DRD2* Y *DBH* (ver ANEXO II tabla2).

Para la amplificación se cargaron 1-2µl cADN y se siguió el protocolo *Taqman Master Mix no amperase*. Brevemente, los volúmenes de los componentes para 20µl totales de reacción son: 1µl cADN (0,5µg/µl) diluido en 8µl H₂O RNase free, 10µl TaqMan Universal PCR Master Mix no amperase 2x, 1µl sonda. Las condiciones de la PCR son: inicialmente 2min. 50°C y 10min. 95°C seguidos de 40 ciclos de 15 seg. 95°C y 1min. 60°C. Mantener a 15°C.

III. Análisis de los resultados

Después de 40 ciclos de PCR fue determinado el Ct (*threshold cycle*), ciclo en el que se empieza a detectar la fluorescencia mediante el software ABI Prism 10 SDS de Applied Biosystems (para más información acerca del método consultar notas técnicas de Applied Biosystems: "*Essentials of real time pcr*" y "*Performing a rq gene experiment*"). Comparando los Ct del control endógeno (GAPDH) y del gen problema respecto a la muestra calibradora (hVM1 y hVM1 high Bcl-X_L a 0d diferenciación), fue calculada la concentración relativa (Livak and Schmittgen, 2001) (Huggett et al., 2005) (Livak and Schmittgen, 2001) de cada gen en cada una de las muestras analizadas. Para determinar la cantidad relativa de cada ARNm en las muestras se utiliza el método de comparación de Ct. En este método se utilizan fórmulas aritméticas para obtener los resultados de cuantificación.

Método de comparación de Ct

$$\Delta Ct = Ct_{\text{muestra}} - Ct_{\text{GAPDH}}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{muestra} - \Delta Ct_{calibrador} \Rightarrow RQ_{comparative\ expression\ level} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Para que el método de comparación de Ct sea válido las eficiencias de amplificación de cada gen y del control endógeno deben ser aproximadamente iguales. Experimentos previos realizados en el laboratorio (mini arrays-DNA en las células de cerebro anterior, Liste I. y Martínez-Serrano A. no publicado) determinaron la elección de GAPDH como un buen control endógeno. En ellos se vio que GAPDH era expresado de manera constante en las células hNS1 y clon5 Bcl-X_L (Liste et al., 2004), sin sufrir modificaciones con la diferenciación. Para poder estar seguros de que GAPDH también permanecía constante en las células derivadas de mesencéfalo ventral, fue realizado un experimento control corriendo muestras en las que se detectó por separado tanto el rRNA18S como GAPDH. Los resultados (no mostrados) fueron similares en ambos casos, no habiendo diferencias en la detección de los Ct. El GAPDH por tanto fue considerado como un buen control endógeno para llevar a cabo este estudio.

Para el análisis de expresión objeto de este estudio, cada ensayo fue realizado por triplicado, tanto a nivel de ARN (réplicas biológicas) como de cADN (réplicas técnicas) haciendo un total de nueve determinaciones.

Cada línea celular fue analizada por separado utilizando la muestra a 0d como calibradora para calcular el RQ. Así se obtuvo el patrón de expresión temporal de cada gen según los días de diferenciación tanto en hVM1 como en hVM1 high Bcl-X_L. Además, estábamos interesados en conocer si los genes estudiados tienen una mayor expresión en hVM1 high Bcl-X_L frente a hVM1. Para ello se calculó el ratio RQ hVM1 high Bcl-X_L/RQ hVM1 de cada gen y día de diferenciación. Valores por encima de 1 indican una mayor expresión en la línea que sobre-expresa Bcl-X_L. También se calculó la expresión relativa de alguno de estos genes respecto del valor obtenido para TH en esa muestra celular y día de diferenciación.

Todos los datos obtenidos se expresan como el valor medio (calculado con un 95% de confianza) \pm error típico de la media. Para determinar si existen diferencias significativas entre las muestras los datos se sometieron a t-Student test ($p < 0,05$ significativo) (Instat 2.03, Graph Pad Software).

4. INMUNOCITOQUÍMICA.

Las células cultivadas sobre cubres de cristal se fijaron con paraformaldehído (PFA, Merck) al 4% en tampón fosfato 0.1M a pH 7.4, durante 15 minutos a temperatura ambiente. Tras 3 lavados en PBS, se procedió a bloquear durante 1h la unión inespecífica del anticuerpo

con una solución de PBS conteniendo 10% de suero de caballo (HS) (Gibco/Life Technologies) o suero de cabra (Gibco/Life Technologies) y un detergente no iónico (Tritón X-100, Merk) al 0.25% para la permeabilización de las células. Posteriormente, las células se incubaron durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario (ver tabla1 en ANEXO II) disuelto en una solución de PBS, 0.25% tritón y suero de caballo-cabra al 1%. Tras retirar la solución del anticuerpo primario y lavar las preparaciones, se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario conjugado con distintos fluorocromos disuelto en PBS (ver listado en Anexoll). Por último, se procedió al marcaje nuclear de las células con Hoechst 33258 (0.2µg/ml en PBS, Molecular Probes) o To-Pro-3 (1:500, Invitrogen), sondas que se intercalan en el ADN y que tras su excitación a diferentes longitudes de onda nos permiten la visualización de los núcleos celulares.

Para la detección de varias proteínas en la misma muestra realizamos inmunofluorescencias dobles, ya que podemos incubar con dos anticuerpos primarios diferentes al mismo tiempo, siempre que estén generados en especies distintas.

En el caso de la detección de neurotransmisores (GABA, Glutamato, Dopamina, Serotonina) la fijación de las células se realizó en presencia de 0,1% de glutaraldehído en la solución de PFA 4%. Para la inmunofluorescencia de receptores de membrana, las soluciones de incubación de bloqueo y anticuerpo primario y secundario no contienen tritón.

Una vez concluido el marcaje, los cubres fueron lavados en PBS y H₂O destilada, se dejaron secar y se montaron con Mowiol (Calbiochem).

5. MICROSCOPIA

El análisis de células y secciones de cerebro de rata por microscopía se realizó en los microscopios de fluorescencia invertidos Leica DM-IRB y Axiovert200 (Zeiss) acoplado a una cámara ccd monocroma y color digital CCD (Coolsnap FX). Para la adquisición de imágenes se utilizó el software Metavue5.07 (Universal imaging). El análisis de microscopía confocal se llevó a cabo en el Microscopio de Barrido Láser confocal LSM510 acoplado a un microscopio invertido Axiovert200 (Zeiss). Se utilizó el programa de análisis de imagen Zeiss LSM510 4.2. Para la adquisición de imágenes de proyección de varios planos se mantuvo una distancia entre ellos de 0.5 µm. Para el análisis morfométrico de las neuritas se utilizó la aplicación NeuronJ del programa Image J (NIH, USA).

Para el análisis y conteo de las muestras de inmunocito-histoquímica, se tomaron fotografías de al menos 5-8 campos al azar de cada muestra en triplicado, y se analizaron posteriormente con el programa Photoshop CS3.

6. **WESTERN BLOTS**

Las células cultivadas en placas p60 fueron brevemente lavadas con PBS frío. Inmediatamente se añadió la solución de lisis (50mM Hepes, 150mM NaCl, 1mM $MgCl_2$, 1mM $CaCl_2$, 10mM $Na_4P_2O_7$, 10mM NaF, 2mM EDTA, 10% glicerol, 1% Nonidet-P40 a la que añadimos inhibidores de proteasas (complete Mini, EDTA-free protease inhibitor cocktail tablets, Roche) e inhibidores de fosfatasa (PhosSTOP tablets, Roche)), también fríos, a las muestras. La solución con las células fue recogida con un *scraper*, sonicada, y a continuación se midió la concentración de proteína presente en el sobrenadante mediante el método de Bradford. Los extractos de proteína total fueron congelados a $-20^{\circ}C$ para su almacenaje.

Para la extracción de proteínas nucleares las células tripsinizadas, tras ser lavadas con PBS frío, se resuspendieron en 250 μ l de solución de lisis + inhibidores (compuesto por Glicerol al 10%, HEPES 15mM, KCl 10mM, $MgCl_2$ 2mM, sacarosa 250mM y DTT 50mM, complete Mini, EDTA-free protease inhibitor cocktail tablets, Roche y PhosSTOP tablets, Roche) y se incubaron en hielo 3 minutos. A continuación se añadió la misma cantidad de medio de lisis + inhibidores suplementado con digitonina al 0,05% con el fin de romper las membranas plasmáticas de las células. Esta suspensión fue lisada con la ayuda de un *potter* para la extracción del homogenizado total de proteínas. A continuación se centrifugó la suspensión de proteínas para obtener tanto el extracto de proteínas nuclear como el citosólico. La cantidad de proteínas fue igualmente determinada mediante ensayo de Bradford.

A continuación, se llevó a cabo una electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de PAGE-SDS según el método de Laemmli (Laemmli, 1970). La concentración de los geles utilizados varió entre el 8% y el 15% de poliacrilamida dependiendo del tamaño de la proteína a analizar, así como de la cantidad de proteína cargada en el gel. En la inmuno-transferencia proteica, realizada según el método de Towbin (Towbin et al., 1979), se emplearon membranas de nitrocelulosa de 0.22 μ m de tamaño de poro (Schleicher & Schuell).

Las membranas fueron incubadas 1h a temperatura ambiente con la solución de bloqueo (5% leche desnatada (El Buen Pastor), 0,05% Tween20 y 5% *fosfobloquer* (Cell Biolabs) disuelto en

TBS pH 7,4). Posteriormente, se incubaron con el anticuerpo primario (ver tabla3 ANEXO II) durante toda la noche a 4°C. Los anticuerpos secundarios empleados estaban acoplados a peroxidasa de rábano para su posterior detección por quimioluminiscencia y fueron:

- HAM/PO (Vector) (de *horse anti-mouse peroxidase*), diluido 1:1000, anticuerpo que se une a anticuerpos primarios monoclonales generados en ratón, y hecho en caballo.
- GAR/PO (Nordic Inmuno) (de *goat anti-rabbit/peroxidasa*), diluido 1:5000 que se une a anticuerpos primarios policlonales y monoclonales generados en conejo, y hecho en cabra
- Donkey anti-Goat/Peroxidase (Jackson ImmunoResearch), diluido 1:5000, que se une a anticuerpos policlonales generados en cabra, y hecho en burro.

Finalmente, los blots se revelaron utilizando el sistema ECL de Amersham Biosciences.

7. ENSAYOS DE ACTIVIDAD DEL TRANSPORTADOR DE DOPAMINA (DAT)

I. “Re-uptake” de dopamina

Las células hVM1 y hVM1 high Bcl-X_L diferenciadas 30 días y cultivos primarios de mesencéfalo ventral de ratón C57/BL6 de E12 mantenidos durante 1 semana fueron utilizadas para medir la cantidad de dopamina que podía ser re-incorporada a las células a través del transportador de dopamina (DAT). Para comprobar la actividad específica del transportador, se utilizó la nomifensina como agente inhibidor de DAT.

Las células se incubaron durante 10 minutos a 37°C con el inhibidor nomifensina (Sigma) a una concentración de 10µM. Posteriormente, se incubaron células tratadas con y sin nomifensina con 50nM de [³H]-DA (dihidroxifeniletilamina 3,4 – (ring-2,5,6-³H), 30-60 Ci/mmol, PerkinElmer) durante 30 min a 37°C (Park et al., 2005). La reacción de re-captura se detuvo aspirando el medio y lavando dos veces con PBS. Las células fueron lisadas añadiendo 200µl/pocillo de NaOH 0,5M y se adicionaron 0,2 ml de líquido de centelleo. La radiactividad incorporada a las células fue medida mediante un contador de líquido de centelleo. La incorporación específica de dopamina fue calculada restando la re-captura no específica (determinada en la presencia de nomifensina) del valor de incorporación sin nomifensina.

Para cada tipo celular y condición se utilizaron 6 muestras y se realizó una ANOVA y un Kruskal-Wallis test (Instat 2.03, Graph Pad Software).

II. Marcaje de células vivas con 4-Di-2-ASP

El ASP+ (4-(-(dietilamino) stiril)-N-metilpirimidina yoduro) es un análogo fluorescente de la 1-metil-4-fenilpirimidina, neurotoxina bien estudiada que es transportada por los transportadores de monoaminas. Para estos experimentos se utilizaron células hVM1 y hVM1 high Bcl-X_L diferenciadas durante 30 días y también cultivos primarios de mesencéfalo ventral de ratón de 1 semana cultivados sobre placas p35 con el fondo de cristal. Las células se incubaron durante 10 minutos a 37°C con el inhibidor de DAT nomifensina (Sigma) a una concentración de 10µM. Posteriormente, se incubaron células tratadas con y sin nomifensina con la sonda ASP+ 0,5µM (Invitrogen) durante 15 min a 37°C. Se retiró el medio y se realizaron al menos tres lavados con la solución *Tyrode* modificada (HEPES 20mM, NaCl 150mM, KCl 4mM, MgCl₂ 2mM y glucosa 10mM) (Biederer and Scheiffele, 2007). Para disminuir la fluorescencia no específica se añade al medio Trypan Blue 30µM (Sigma). Se recogen imágenes de fluorescencia para capturar la señal del ASP+ (excitación de 488nm y emisión de 607nm) y de campo claro para visualizar el cultivo celular con un Microscopio de Barrido Láser confocal LSM510 acoplado a un microscopio invertido Axiovert200 M (Zeiss).

III. Tratamiento de los cultivos con 6-OHDA

Células cultivadas en cubres de cristal hVM1 y hVM1 high Bcl-X_L diferenciadas durante 30 días fueron tratadas con 50 µM 6-hidroxidopamina (6-OHDA, Sigma) en presencia/ausencia de nomifensina 10µM (Sigma) durante 1, 2 ó 3 días. Tras la exposición a la toxina, las células fueron fijadas y se realizó un marcaje de inmunofluorescencia para TH para evaluar el porcentaje de neuronas dopaminérgicas mediante la tinción con TH. Las células TH positivas fueron contadas usando un microscopio de fluorescencia invertido Axiovert200 (Zeiss) acoplado a una cámara ccd monocroma y color (Coolsnap FX) a 40x. Cada experimento fue realizado por triplicado, tomándose 7 campos al azar por muestra, y se analizó mediante ANOVA de una vía y pos hoc Tukey's test (Instat 2.03, Graph Pad Software).

8. IMAGEN DE LA ENDOCITOSIS Y EXOCITOSIS DE LAS VESÍCULAS SINÁPTICAS

El FM4-64 es un miembro de la familia de sondas de estirilo que se utilizan como marcadores de sinapsis activas. Los experimentos se realizaron en células hVM1 y hVM1 high Bcl-X_L diferenciadas 12 y 30 días sobre placas p35 con el fondo de cristal. Las células se incubaron con la sonda FM4-64 (Invitrogen) 8μM durante 5min a 37°C. Posteriormente, se añadió una solución de alto K⁺ (NaCl 39mM, KCl 100mM, glucosa 10mM, HEPES 10mM, MgCl₂ 2mM y CaCl₂ 2mM) durante 15min para estimular la entrada de FM4-64 en las células mediante depolarización. Finalmente, se lavan las placas con una solución sin Ca²⁺ (solución *Tyrode* modificada: HEPES 20mM, NaCl 150mM, KCl 4mM, MgCl₂ 2mM y glucosa 10mM) para evitar la exocitosis espontánea y se dejan a 37°C durante 15min para completar la endocitosis. Tras lavar un par de veces con la misma solución, se tomaron fotos en un Microscopio de Barrido Láser confocal LSM510 acoplado a un microscopio invertido Axiovert200 M (Zeiss). Para comprobar la disminución del marcaje fluorescente y con ello la exocitosis, las placas fueron nuevamente incubadas con la solución de alto K⁺ y se volvieron a tomar imágenes.

9. ANÁLISIS MORFOMÉTRICO

La distribución de las neuritas de las células TH+ en cultivos de hVM1 y hVM1 high Bcl-X_L diferenciados 20 y 30 días fue analizada mediante la técnica descrita en (Popko et al., 2009). Brevemente, las células TH positivas obtenidas tras la inmunofluorescencia son fotografiadas a partir de campos seleccionados al azar a 20x en un microscopio invertido Axiovert200 (Zeiss) acoplado a una cámara ccd monocroma y color (Coolsnap FX). Para cada tipo celular y condición se analizaron al menos 50 células TH⁺. Mediante la aplicación NeuronJ del programa ImageJ (NIH, USA), podemos trazar semiautomáticamente las prolongaciones celulares y asignarles la condición de neurita primaria, secundaria, terciaria o cuaternaria. Posteriormente, se calculan diversos parámetros como el número medio de neuritas por célula TH+, la longitud total y media por célula de cada tipo de neurita o la longitud total y media de las neuritas según el tipo celular y día de diferenciación.

10. ESTUDIOS DE IMAGEN DE CALCIO CITOSÓLICO

Las células hVM1 y hVM1 high Bcl-X_L diferenciadas 7 y 12 días sobre cubres de cristal cubiertos con polilisina fueron cargadas con 10μM de la sonda Fura-2 AM 10μM (Molecular Probes) y 0,02% de Plurónico F-127 (Molecular Probes) durante 30min a 37°C en medio HBSS (1,26mM CaCl₂, 0,40mM MgSO₄, 5,33mM KCl, 0,44mM KH₂PO₄, 4,16mM NaHCO₃, 137,93mM NaCl, 0,33mM Na₂HPO₄, 5,55mM Glucosa). Posteriormente se lavaron 20min en medio HBSS sin Fura-2. Se montaron los cubres en una cámara de perfusión en la pletina del microscopio mantenida a 37°C según el protocolo descrito en (Ruiz et al., 1998). La imagen de Fura-2 fue registrada radiométricamente usando excitaciones alternas de 340 y 380nm y un filtro de emisión de 510nm con un objetivo Neofluar 40x/0,75. El cambio en la concentración de calcio citosólico ($[Ca^{2+}]_i$) en una sola célula fue expresado como el ratio de la intensidad de fluorescencia entre 340 y 380nm. La adquisición de imágenes y su análisis fue realizada con el software Aquacosmos 2.5 (Hamamatsu). Las variaciones de calcio se midieron tras la despolarización de la membrana con 60mM KCl. Para la adición del KCl, la cámara de registro fue perfundida con una solución de HBSS isosmótica con 60mM de KCl. La adición de diversos neurotransmisores fue hecha como “bolos” añadidos a los tiempos indicados en las siguientes concentraciones: 100μM dopamina (DA) (Sigma); 100μM γ-ácido aminobutírico (GABA) (Tocris Cookson); 100μM Glutamato (Glu) (Sigma). Para el bloqueo de la respuesta mediada por receptores se utilizaron dos antagonistas selectivos: 5-metil-10,11-dihidro-5-dibenzocicloheptano-5,10-imina maleato (MK-801, 50μM, Tocris Cookson) para los receptores de glutamato del subtipo NMDA y picrotoxina (PTX, 100μM, Tocris Cookson) en el caso de los receptores de GABA_A.

11. ELECTROFISIOLOGÍA

Las propiedades funcionales de las células hVM1 y hVM1 high Bcl-X_L fueron evaluadas mediante técnicas de *whole-cell-patch clamp* descritas previamente en (Parish et al., 2008). Brevemente, los cubres de cristal con las células diferenciadas fueron transferidos a una cámara de registro a temperatura ambiente, atmósfera del 95% O₂ y 5% CO₂ y un sistema de perfusión continua de (3ml/min) líquido cerebroespinal artificial (aCSF) compuesto por: 119mM NaCl, 2,5mM KCl, 1,3mM MgSO₄, 2,5mM CaCl₂, 26,2mM NaHCO₃, 1mM NaH₂PO₄ y

11mM Glucosa (300 mOsm y pH 7,4). Los registros de *whole-cell patch clamp* fueron realizados utilizando un microscopio de video contraste de interferencia diferencial infrarrojo (BX50WI, olympus). La resistencia de la punta de la pipeta de registro era de 3,5-5 MΩ al llenarse con la solución de K-gluconato 122.5mM, KCl 17,5mM, NaCl 8mM, KOH-HEPES 10mM, KOH-EGTA 0,2mM, MgATP 2mM y Na3GTP 0,3mM (295 mOsm y pH 7,2). Las corrientes y voltajes de las células fueron amplificadas mediante un amplificador EPC10, HEKA Elektronik.

I. Cultivos organotípicos y co-cultivos

Los cultivos organotípicos se realizaron a partir de secciones coronales de 250μm de la región del estriado de ratones Balb/c de 6-7 días de edad. Los ratones neonatos fueron decapitados y tras la extracción del cerebro, éste fue depositado en una placa con aCSF frío aireado con 5% CO₂ en presencia de oxígeno. Cada hemisferio fue separado y embebido en agar para ofrecer un soporte mecánico a la hora de realizar los cortes en el vibratomo en medio maCSF a 4°C. Los cortes individuales se depositaron en las cestas con inserto de membrana de Millipore 0,4μm (Millipore, PICM01250) y, a su vez, cada cesta fue colocada en un pocillo de placas P24 (Falcon) con 240μl de medio de cultivo (50% MEM, 25% suero de caballo, 18% HBSS, 2%B27 y un suplemento de antibióticos (penicilina/estreptomicina), glutamina, glucosa y sacarosa descrito en (Cronberg et al., 2004)) Se cambió el medio 3 veces a la semana y los cultivos fueron mantenidos a 37°C en una atmósfera de 90% humedad y 5%CO₂.

Los co-cultivos de secciones de estriado y células hVM1 high Bcl-X_L se iniciaron con el depósito de 500-1000 células en 1μl de medio sobre el estriado en el primer día del cultivo organotípico. Para un mejor reconocimiento visual de las células a la hora de realizar los registros de electrofisiología, previamente a su implante las células fueron transducidas con un vector lentiviral CMV-GFP para incrementar su fluorescencia verde.

Los co-cultivos fueron mantenidos a 37°C en una atmósfera de 90% humedad y 5%CO₂, con cambios de medio 3 veces a la semana, hasta el día 85, último punto de evaluación electrofisiológica.

La comparación de parámetros entre las líneas celulares fue hecha mediante un análisis de T-test de Student, para los cambios dentro de una línea celular se realizaron regresiones lineales. El nivel de significación se fijó en p<0,05.

12. MARCAJE DE LAS CÉLULAS hVM1 HIGH BCL-X_L CON NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE HIERRO SUPERPARAMAGNÉTICAS.

I. Experimentos “in vitro”.

Se procedió al marcaje de las células “in vitro” con nanopartículas superparamagnéticas (NNP) formadas por un núcleo de magnetita (óxido ferroso-diférrico (Fe_3O_4)) y una cobertura de dextrano. Las NNP son relativamente uniformes en tamaño, poseen forma esférica y naturaleza superparamagnética. Tras su internalización en las células las NNP pueden ser fácilmente detectables en el citoplasma celular y pueden ser usadas como agente de contraste en imágenes de resonancia magnética (IRM) para monitorizar durante largos periodos de tiempo ratas adultas trasplantadas con células marcadas sin sacrificar al animal. En estos experimentos se utilizan las siguientes NNP:

Abreviatura	Tamaño (nm)	Cobertura	Fluorescencia	Casa comercial
NNP-250-Dx	250	dextrano	no	G.Kisker
NNP-50-Dx	50	dextrano	no	G.Kisker
NNP-100-Dx	100	dextrano	no	Endorem
NNP-100-Dx-R	100	dextrano	rojo ex 578- em 613 nm	Chemicell

Tabla1. Tipos de NNP utilizados en el marcaje de las células hVM1 high Bcl-X_L.

II. Determinación de la concentración de NNP y el tiempo de incubación

Las células hVM1 high Bcl-X_L fueron sembradas sobre cubres de cristal a una densidad de 50.000 células/pocillo de placas p24. Tras 24h en medio de proliferación, se añadieron las NNP a diferente concentración, tratamiento con distintos agentes químicos que puedan favorecer su internalización y tiempo de incubación:

- Tipo de NNP: 250-Dx, 50-Dx y 100-Dx-R
- Concentración: 20, 50, 100 y 400 $\mu\text{gFe/ml}$ de medio de cultivo
- Tiempo de incubación: 3, 6, 12, 24 y 72h.
- Tratamiento previo de las NNP: sin tratar, tratadas con poli-lisina (0,03 $\mu\text{gPLL}/\mu\text{gFe}$, Sigma) o con protamina (0,5 $\mu\text{gPTM}/\mu\text{g Fe}$, Sigma). Las NNP fueron incubadas en medio de proliferación más PLL o PTM durante 24h y agitación constante a temperatura ambiente antes de ser añadidas a los cultivos celulares.

Tras el tiempo de incubación establecido las células fueron lavadas con medio de cultivo y posteriormente con PBS para eliminar las NNP no incorporadas. Posteriormente, las células se fijaron con paraformaldehído (PFA, Merck) al 4% en tampón fosfato 0.1M a pH 7.4, durante 15 minutos a temperatura ambiente y se realizó un marcaje de inmunofluorescencia para marcar el dextrano de las NNP (excepto en el caso de las NNP rojas) utilizando un anticuerpo anti-dextrano (Stem Cell Technologies). Además, las células se incubaron con ToPRO-3 (marcador de ácidos nucleicos) y faloidina A488 para marcar los filamentos de F-actina y delimitar la forma celular, lo que nos permite determinar si las NNP están incluidas o no en el citosol. Se calculó el porcentaje de células que incorporaba NNP según cada condición estudiada mediante el análisis en un Microscopio de Barrido Láser confocal LSM510 acoplado a un microscopio invertido Axiovert200 (Zeiss).

III. Ensayos de viabilidad celular.

La viabilidad celular en los cultivos marcados con NNP fue evaluada mediante el ensayo de MTT en células hVM1 high Bcl-X_L a 0 y 7 días de diferenciación. El ensayo de MTT es un test colorimétrico para medir la actividad de las enzimas que reducen el Bromuro de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) a formazán, originándose un color púrpura en el pocillo. Esta reacción de reducción sólo tiene lugar cuando el enzima succinato deshidrogenasa está activo, por lo que el cambio de color puede usarse como una medida de las células vivas del cultivo (Hansen et al., 1989). Las células fueron sembradas a una densidad de 100.000 células/pocillo de placa p24 en 0,5ml de medio de cultivo. Después de finalizar cada tratamiento se añadieron 125µl de MTT 5mg/ml (Sigma M-2128) y se dejó 60min a 37°C. A continuación, se añadieron 1ml de DMSO por pocillo para extraer el formazán y se midió la absorbancia a 570nm en un espectrofotómetro.

IV. Efecto de las NNP sobre la diferenciación celular.

Células hVM1 high Bcl-XL sin marcar e incubadas con NNP-50-Dx+PTM o NNP-100-Dx-R (a una concentración de 50µgFe/ml durante 48h) fueron sembradas en placas p24 con cubres de cristal tratados con poli-lisina a una densidad de 50.000 células/pocillo. Para evaluar el posible efecto de las NNP en la diferenciación de las células se realizaron estudios de inmunofluorescencia de cultivos con y sin NNP diferenciados 0d para el marcador nestina y 7

días para los marcadores β -III-Tubulina, TH y GFAP (ver anexo II para dilución de los anticuerpos). Posteriormente, el porcentaje de cada población celular fue determinado y comparado frente a cultivos de las mismas células sin NNP.

V. Ensayo de ciclo celular

Para determinar si el marcaje con NNP podría afectar al ciclo celular de las hVM1 high Bcl-X_L, se realizó un análisis del ciclo celular en células sin marcar y tratadas con NNP-100-Dx (50 μ gFe/ml) mediante tinción con ioduro de propidio y citometría de flujo utilizando la técnica de Nicoletti (Nicoletti et al., 1991). Las células fueron sembradas a una densidad de 300.000 células/pocillo de placas p6. Tras 24 y 48h de incubación con las NNP, se tripsinizaron y lavaron en PBS (sin Ca/Mg²⁺). Las células fueron centrifugadas 10min a 1000rpm a 4°C descartando el sobrenadante. El sedimento se mezcló con 1ml de etanol al 70% frío empleando el *vortex*. Tras 18h de fijación en etanol a -20°C las muestras fueron resuspendidas cuidadosamente y centrifugadas 5min a 1500rpm. Se descartó el sobrenadante y el sedimento fue resuspendido en 0,5ml de tampón de ciclo (50 μ g/ml ioduro de propidio, 0,1% citrato sódico, 50 μ g/ml ribonucleasa A en PBS sin Ca²⁺ ni Mg²⁺), dejándose 30min a temperatura ambiente para su marcaje. El ioduro de propidio (IP) tiene la particularidad de intercalarse en el ADN cuando la integridad de la membrana plasmática está dañada o permeabilizada (en este caso con saponina), por tanto, se puede utilizar como marcador de las fases del ciclo celular, siendo la emisión de fluorescencia directamente proporcional al contenido de ADN de la célula. A continuación, las células se analizaron mediante citometría de flujo (Citómetro de flujo FACSCalibur, Becton Dickinson) utilizando el láser de argón 488nm para su excitación y el filtro de 585/42nm para la recogida de emisión (Canal FL-2). La intensidad de fluorescencia se representa en escala lineal (distribución de ciclo celular) y los datos fueron analizados para la cuantificación de las regiones sub-G0-G1 (menos de 2n de ADN o ADN fragmentado), G0-G1 (2n de ADN) y S-G2-M (en fase mitótica activa, es decir con una cantidad de ADN entre 2n y 4n). Para el análisis del ciclo celular se utilizó el software FloJo7.

VI. Pérdida del marcaje de las células con NNP con los pases en cultivo

Las células fueron incubadas con NNP-50-DX y 100-Dx-R a 50 μ gFe/ml durante 48h en placas p60. Posteriormente, se tripsinizaron y sembraron en cubres de cristal (pase 0) y placas p60. Nuevamente, estas placas fueron tripsinizadas y sembradas en cubres de cristal (pase 1) y

placas p60. Así se procedió hasta alcanzar el pase 4. Las células se fijaron y se procedió a realizar una tinción por inmunofluorescencia para marcar las NNP con dextrano (excepto para las NNP con fluorescencia roja), faloidinaA488 y TopRo3. Se calculó el porcentaje de células que incorporaba NNP según cada condición estudiada mediante el análisis en un Microscopio de Barrido Láser confocal LSM510 acoplado a un microscopio invertido Axiovert200 (Zeiss).

VII. Experimentos “in vivo”: trasplante de células hVM1 high Bcl-X_L marcadas con NNP en roedores

Todos los experimentos realizados en animales de experimentación, se hicieron de acuerdo a las normas establecidas por la *Society for Neuroscience* (USA), por el Instituto Nacional de Salud (NIH) y por la directiva europea referente a la Experimentación animal (86/609/EEC).

a) Animales utilizados

Los experimentos realizados se llevaron a cabo en animales adultos. Se utilizaron ratas hembras de la especie *Sprague Dawley* de 3 meses de edad y un peso medio de 200gr. Los animales fueron inmunosuprimidos 2 días antes de iniciar los trasplantes con inyecciones intra-peritoneales de Ciclosporina A (15 mg/Kg, Sandimmun, Novartis), que se mantuvieron diarias hasta el final del experimento. Todos los animales fueron mantenidos en un ciclo de 12h luz/12h oscuridad con agua y alimento *ad libitum*.

b) Modelo hemiparkinsoniano

El modelo experimental empleado fue de hemiparkinsonismo generado tras la administración de la neurotoxina 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA) en el haz prosencefálico medial (definido en inglés como MFB: *medial forebrain bundle*) en el hemisferio derecho (Sauer and Oertel, 1994; Yuan et al., 2005). La neurotoxina 6-OHDA causa la degeneración de las células neuronales dopaminérgicas, tanto en su cuerpo celular (en la Sustancia Nigra pars compacta (SNpc)) como en sus prolongaciones localizadas en el estriado. El compuesto 6-OHDA es internalizado mediante el transportador de dopamina (DAT) de las neuronas dopaminérgicas y al penetrar en la mitocondria genera un estrés oxidativo responsable de la

muerte celular y la degeneración completa del sistema nigroestriatal (Berger et al., 1991; Jeon et al., 1995).

Las coordenadas utilizadas para la inyección de 6-OHDA en el MFB (*medial forebrain bundle*) fueron calculadas desde bregma en mm:

- *TB (Tooth Bar, barra dental): -3,3*
- *AP (antero-posterior): -3,7*
- *ML /medio lateral): -1,6*
- *V (dorso-ventral): -8,4*

Estas coordenadas se establecieron según el atlas de cerebro de rata (Paxinos and Watson, 1986). La inyección de 6-OHDA se realizó con una jeringa Hamilton de 10µl. La velocidad de inyección fue de 1µl por minuto, manteniendo la jeringa al menos 5 minutos antes de ser retirada. Para minimizar la oxidación de la 6-OHDA, ésta fue preparada en solución salina suplementada con 0,02% de ácido ascórbico y mantenida a 4°C y en oscuridad durante su uso. Cada hora se preparó una nueva alícuota eliminando la antigua antes de que ocurra un cambio de color en la suspensión, indicio de una degradación de la toxina 6-OHDA

c) **Test de comportamiento: medidas de rotación inducidas por drogas**

Las rotaciones inducidas por drogas se usan para determinar el grado de la lesión producida por la neurotoxina 6-OHDA (Yuan et al., 2005). Estos ensayos, en los modelos de lesión unilateral, permiten analizar el desequilibrio en la liberación de dopamina o la sensibilidad a este neurotransmisor existente de un hemisferio con respecto al otro. Esta descompensación induce al animal a moverse en círculos de manera espontánea o tras la administración de drogas. En estos estudios se utilizaron dos drogas distintas: la D-anfetamina y la apomorfina, dejando al menos 1 semana de reposo entre ensayos para evitar interferencias de las drogas (Kirik et al., 1998; Ziegler and Szechtman, 1990). Los ensayos se llevaron a cabo utilizando un rotómetro (LE902 Rotation Meter, Panlabs) acoplado a un sistema automatizado de registro (LE3806 Multicounter, Panlabs) capaz de contabilizar las rotaciones hacia la derecha y hacia la izquierda de los animales durante el experimento.

En animales correctamente lesionados, la inyección de **D-anfetamina** (Sigma) produce la liberación de DA desde las reservas del estriado no lesionado y genera un aumento de la descompensación de liberación de DA entre los dos hemisferios, lo que resulta en una rotación

ipsilateral a la lesión (Ungerstedt and Arbuthnott, 1970; Zetterstrom et al., 1983). Las rotaciones ipsilaterales totales son contabilizadas durante una hora:

$$\text{Rot. ipsilaterales /min} = (\text{rot. derecha totales} - \text{rot. izquierda totales}) / 60\text{min}$$

Los registros de las rotaciones se llevaron a cabo cada 2 minutos.

El compuesto D-anfetamina es diluido en una solución de suero salino e inyectado intraperitonealmente a los animales en una dosis de 5 mg/kg. Los test se llevaron a cabo durante 1 hora, en el ambiente más tranquilo posible.

En animales correctamente lesionados, la **apomorfina** (Sigma) (agonista de los receptores de DA) genera un comportamiento rotacional contralateral a la lesión debido a la “supersensibilidad” de los receptores dopaminérgicos del estriado en el hemisferio lesionado a causa de un incremento de los receptores de DA en las células receptoras (Creese et al., 1977). Las rotaciones contralaterales totales son contabilizadas durante 60 minutos:

$$\text{Rot. contralaterales/min} = (\text{rot. izq totales} - \text{rot. derecha totales}) / 60\text{ min}$$

La apomorfina se diluye en una solución de suero salino y ácido ascórbico (0,2mg/ml) y es inyectada subcutáneamente a los animales a una concentración de 0,25mg/Kg. Los test se llevaron a cabo durante 40 minutos, registrándose las rotaciones cada 2 minutos, en el ambiente más tranquilo posible.

Los test de comportamiento se utilizaron para evaluar el grado de la lesión de los animales tratados con 6-OHDA.

d) **Trasplante de células hVM1 high Bcl-XL con NNP en estriado de animales lesionados**

Para los experimentos de trasplante, las células hVM1 high Bcl-X_L y hVM1 high Bcl-X_L con NNP fueron cultivadas en condiciones de proliferación durante 48h. Se comprobó *in vitro* que en las suspensiones celulares usadas para el trasplante, más del 90% de las células estaban marcadas con NNP y su diferenciación a los 7d era igual a la observada en esa línea celular en células sin marcar con NNP.

Las células, cerca de confluencia, fueron tripsinizadas, centrifugadas y resuspendidas a una densidad de 100.000 células/μl en HBSS con Ca²⁺ y Mg²⁺ (*Hank's balanced salt solution*, Gibco).

Durante el tiempo transcurrido entre la preparación de la suspensión y el momento del trasplante, las células se mantuvieron en hielo (4°C), siendo este tiempo menor de 30 minutos. Los animales adultos fueron anestesiados intraperitonealmente con una mezcla de clorohidrato de ketamina (Ketolar, Warner-Lambert) y medetomidina (Domtor, Orion) diluída 1:5 en suero fisiológico (Braun). Se administró una dosis de 0,075ml de Ketamina y 0,1 ml de metedomina (diluída 1:5) por cada 100 gr de peso. Tras la cirugía, se suministró 0.1 ml de atipamezol (Antisedán, Orion) para la recuperación rápida de la anestesia.

El procedimiento de trasplante se realizó mediante la técnica de inyección estereotáxica. Para la localización de las coordenadas se tomó bregma (punto de intersección entre la sutura sagital y coronal del cráneo) como punto de referencia. Para la coordenada ventral, el punto de referencia es la dura madre. Se realizó un único depósito de 300.000 células en el estriado derecho de los animales, cuyas coordenadas en mm desde Bregma son:

- TB: -2,3
- AP: +1mm
- ML: -3
- DV: -4,5

Para llevar a cabo la inyección de células, se empleó una jeringa de vidrio de 10µl (Hamilton) con aguja biselada. Los depósitos de células se realizaron manualmente a una velocidad de 0.5µl cada 60 segundos. Una vez finalizados la aguja se mantuvo cinco minutos en su posición antes de ser retirada lentamente.

De 20 animales lesionados tras realizar los test de comportamientos descritos en el apartado anterior, se determinó que 15 animales estaban correctamente lesionados y podían ser trasplantados.

En el caso del **primer experimento** de implante de diferentes tipos de NNP para comprobar su detección en imagen de resonancia magnética, las NNP (5µg/3µl) se inyectaron tanto en el hemisferio izquierdo como en el derecho de los animales (ML: +/-3). Las NNP utilizadas fueron:

Expmto 1	Hemisferio izquierdo	Hemisferio derecho
rata 1	NNP-100-Dx-R	NNP-250-Dx
rata 2	NNP-50-Dx	NNP-100-Dx

Los animales fueron llevados a los 6 días post-trasplante para obtener la IRM.

Para el **segundo experimento** se trasplantó 1 animal con células marcadas NNP-50-Dx (48h, 50µgFe/ml, tratadas con PTM) en el estriado derecho y células sin marcar en el estriado izquierdo para averiguar si el trasplante (sin NNP) podía generar algún tipo de fondo en la IRM. El animal fue analizado periódicamente mediante IRM hasta los 2 meses post-trasplante.

Expmto 2	Estriado izquierdo	Estriado derecho	IRM
rata 1	hVM1 high Bcl-X _L sin NNP	hVM1 high Bcl-X _L NNP-50-Dx + PTM	48h, 2,4 y 8 semanas

En el **tercer experimento** se trasplantaron 2 ratas con células hVM1 high Bcl-X_L marcadas con NNP-100-Dx-R (50µgFe/ml) en el estriado derecho para averiguar si estas NNP eran detectables tanto por IRM como mediante microscopía confocal tras varias semanas después del trasplante.

Expmto 3	Estriado izquierdo	Estriado derecho	IRM
rata 1		hVM1 high Bcl-X _L NNP-100-Dx-R	1, 4 y 6 semanas
rata 2		hVM1 high Bcl-X _L NNP-100-Dx-R	1, 4 y 6 semanas

En el **cuarto experimento** se trasplantaron 5 ratas con lesión de 6-OH en el estriado derecho con células hVM1 high Bcl-X_L y otras 5 ratas con células hVM1 high Bcl-X_L marcadas con NNP-100-Dx-R (50µgFe/ml). Las ratas trasplantadas con NNP se examinaron mediante IRM hasta los 5 meses post-trasplante para seguir el destino de las células trasplantadas e intentar co-localizar la ubicación del trasplante con una posible señal de C¹¹-DTBZ obtenida mediante PET-que indicaría presencia de terminales dopaminérgicos en la zona lesionada.

Expmto 4	Estriado izquierdo	Estriado derecho	IRM	PET
ratas 1-5		hVM1 high Bcl-X _L		5 meses
ratas 6-10		hVM1 high Bcl-X _L NNP-100-Dx-R	2-5 meses	5 meses

Varios animales de este experimento a largo plazo murieron durante el transcurso del mismo, muy posiblemente debido a la inyección diaria de Ciclosporina A. Otros no presentaban trasplante cuando fueron analizados histológicamente 5 meses después del mismo.

e) Imagen de resonancia magnética (IRM).

Los experimentos de imagen de resonancia magnética (IRM) fueron realizados en el C.A.I. de Resonancia Magnética Nuclear y de Spin Electrónico de la Universidad Complutense de Madrid con la ayuda de M^a Encarnación Fernández Valle y David Castejón Ferrer. Se utilizó el BIOSPEC BMT 47/40 (Bruker, Ettlingen, Alemania), el cual opera a 4,7 Teslas y está equipado con un sistema de escudo gradiente de 12 cm activo.

Las ratas fueron anestesiadas con una mezcla de oxígeno e isofluorano. Una vez dormidas fueron colocadas en posición de prono sobre una pletina de 7cm de longitud, con la cabeza inmovilizada y conectadas a una sonda de radiofrecuencia para monitorizar la frecuencia cardíaca, respiratoria y la temperatura del animal durante la adquisición de las imágenes.

Primero se determinaron los parámetros globales para el centrado y la recogida óptima de la imagen en T2* y posteriormente se realizaron 3 imágenes exploratorias de eco-spin en dirección axial, sagital y coronal (TR/TE = 200/10 ms, matrix = 128x128). Para la visualización de las células trasplantadas marcadas con NNP se realizó una secuencia de eco-gradiente utilizando los siguientes parámetros: TR = 250 ms, TE = 10 ms, ángulo de giro = 30°, grosor de las secciones = 1 mm, número de secciones = 8, número de medias = 6, FOV = 3x3 cm², matrix = 256x192. El tamaño de la matriz reconstruida era de 256x256. El tiempo de adquisición para estos experimentos fue de 4 minutos y 48 segundos. Las imágenes fueron posteriormente analizadas con el programa ImageJ.

f) Análisis histológico del tejido (IHC)

Los animales fueron anestesiados con hidrato de cloral (150mg/ml) disuelto en NaCl al 0.9% y perfundidos intracardialmente con NaCl 0.9% (100ml en 5 min aproximadamente) y PFA al 4% en 0.1M de PB a pH 7,4, frío, (200 ml en 15 min.). Se procedió a la extracción de los cerebros, los cuales se mantuvieron en PFA 4% durante toda la noche y después se equilibraron en sacarosa al 30% en PBS a 4°C. Se utilizó un criotomo de congelación para cortar los cerebros en secciones de 30µm de grosor, y se conservaron en una solución crioprotectora (compuesta de 0,05M PB (Phosphate Buffer), etilenglicol y glicerol) a -20°C hasta su procesamiento.

Al empezar con la inmunohistoquímica, las secciones conservadas en la solución crioprotectora se lavaron 3 veces en PBS.

Para un revelado con DAB se inhibió la actividad peroxidasa endógena del tejido aplicando una solución de metanol 10% y H_2O_2 3% en PBS durante 20 minutos. Posteriormente, se lavaron 3x10 minutos con PBS y se bloqueó la unión inespecífica del anticuerpo mediante la incubación durante 1h con una solución de PBS, 10% suero caballo (Gibco) y Tritón X-100 al 0,25% (Merck). Las secciones fueron posteriormente incubadas con el anticuerpo primario (ver anexo II) disuelto en una solución de PBS, 0,25% Tritón X-100 y suero de caballo o cabra al 1% durante toda la noche a 4°C. Esta solución se empleó también para lavar el anticuerpo primario e incubar 2h con el anticuerpo secundario biotinilado (BA1000 anti-conejo, BA4000 anti-rata, BA6000 anti-oveja, disueltos 1:200, Vector) a temperatura ambiente. A continuación, las secciones se incubaron con un complejo de avidina-biotina-peroxidasa (ABC, Vector) en PBS, que se reveló con el cromógeno 1,3- diaminobencidina (DAB, Sigma) disuelto al 0,05% en PBS, NiCl_2 8% y H_2O_2 0,03%. El producto de esta reacción forma un precipitado negro localizado en las regiones del tejido donde se unió el anticuerpo primario. Tras el revelado, las secciones fueron lavadas en PBS y H_2O destilada y se montaron sobre portas tratados con polilisina. Se dejaron secar a temperatura ambiente, y tras deshidratarse pasando 10 minutos por un gradiente creciente de etanol (50%-90%-100%) y 10 minutos en xileno, fueron montadas con DPX (BDH).

En el caso de inmunohistoquímica fluorescente, las secciones se incuban con la solución de bloqueo (descrito arriba) 1h a temperatura ambiente. Posteriormente, se incubaron durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario (ver tabla4 en anexo II) disuelto en una solución de PBS, 0.25% tritón y suero de caballo o cabra al 1%. Tras retirar la solución del anticuerpo primario y lavar las secciones, se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario conjugado con distintos fluorocromos disuelto en PBS. Por último, se procedió al marcaje nuclear de las células con Hoechst 33258 (0.2µg/ml en PBS, Molecular Probes) o To-Pro-3 (Invitrogen), sondas que se intercala en el ADN y que tras su excitación a diferentes longitudes de onda nos permiten la visualización de los núcleos celulares.

Para la detección de varias proteínas en la misma muestra realizamos inmunofluorescencias dobles, ya que podemos incubar con dos anticuerpos primarios diferentes al mismo tiempo, siempre que estén generados en especies distintas.

Una vez concluido el marcaje, las secciones fueron lavadas en PBS y H_2O destilada y se montaron sobre portas cubiertos de poli-lisina. Se dejaron secar y se montaron con Mowiol (Calbiochem).

g) Estudios de PET.

Estos estudios se llevaron a cabo en el Centro de Investigaciones Médico Sanitarias (CIMES) de Málaga.

Síntesis de ^{11}C -(1)- α -dihidrotetrabenazina

En este estudio se ha utilizado el isómero (+)- α -DTBZ, ya que el enantiómero (-)- α -DTBZ no presenta afinidad por los VMAT2 y causa que el uso de la mezcla racémica disminuya la especificidad y reduzca el contraste de las imágenes obtenidas. La síntesis de ^{11}C -(+)-DTBZ se llevó a cabo utilizando el módulo Tracerlab FXc de General Electric (versión *Nuclear Interface*), mediante un método automático que se compone de una secuencia de pasos dependientes del tiempo. El $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ se produjo mediante la reacción $^{14}\text{N}(p, \alpha)^{11}\text{C}$ en un ciclotrón *Cyclone* 18/9 (IBA), bombardeando una mezcla de ^{14}N con 0,5 % de O_2 . Tras el bombardeo se transfirió el gas radiactivo al módulo de mutilación, donde se produjo la reducción con LiAlH_4 en THF; posteriormente se incrementó la temperatura del reactor, momento en el que se adicionó HI para producir $^{11}\text{CH}_3\text{I}$, que se utiliza como precursor primario, y se destiló hasta el segundo reactor, donde se coloca el precursor de la síntesis [(+)-desmetildihidrotetrabenazina] disuelto en dimetilsulfóxido (DMSO) e hidróxido de potasio (KOH). La purificación final se llevó a cabo mediante dos cartuchos de alúmina y la evaporación de disolventes mediante evaporación. El producto final se esterilizó a través de un filtro de 0,22 μm .

Animales

Los animales control y trasplantados fueron estudiados con el marcador ^{11}C -(+)-DTBZ. Para asegurar la inmovilización durante todos los estudios microPET, las ratas fueron anestesiadas inhalatoriamente mediante isoflurano (2 % de isoflurano en 100 % de O_2). El radiotrazador fue inyectado (volumen 0,2-1ml, 2-3mCi) inmediatamente tras su síntesis de manera intraperitoneal o en la vena de la cola de los animales tras ser anestesiados. Tras unos minutos para que se produzca una distribución correcta del radiofármaco, se procedió a la detección de su señal mediante el equipo PET para pequeños animales (Mosaic, Phillips). Las imágenes fueron posteriormente analizadas con el programa Osiris para el estudio de imágenes médicas.

ANEXO II

Tabla 1: Anticuerpos usados en ICC

Anticuerpos Primarios		Dilución	Casa comercial
5'HT	pAc	1:500	Chemicon
Anti Cav 2.1	pAc	1:300	Alomone labs
Anti Cav 2.2	pAc	1:300	Alomone labs
Anti hCav 1.2	pAc	1:500	Alomone labs
Anti-Kv 3.4	pAc	1:300	Alomone labs
Anti-Pan Nav	pAc	1:300	Alomone labs
Calbindina	mAc	1:200	Sigma
Calretinina	pAc	1:1000	Chemicon
DAT	mAc	1:500	Chemicon
Dextrano	mAc	1:500	Stem Cell Tech.
Dopamina	mAc	1:1000	Fitzgerald
DRD2	pAc	1:500	Millipore
GABA	pAc	1:2000	Sigma
GABABR1	pAc	1:500	Alomone labs
GFAP	pAc	1:1000	DAKO
GFAP	mAc	1:1000	Sigma
GIRK2	pAc	1:100	Alomone
GluR 2/3	pAc	1:500	Millipore
Glutamato	pAc	1:1000	Sigma
Nestina	mAc	1:500	BD Bioscience
Nestina	pAc	1:1000	Abcam
NMDAR2A	pAc	1:500	Alomone labs
Parvalbúmina	pAc	1:1000	Millipore
Serotonina	pAc	1:1000	Sigma
TH	pAc	1:1000	Chemicon
TH	mAc	1:1000	Sigma
Vimentina	mAc	1:1000	Sta. Cruz
VMAT2	pAc	1:500	Chemicon
β -Tubulina III	pAc	1:1000	Sigma
β -Tubulina III	mAc	1:1000	Sigma

Anticuerpos Secundarios		Dilución	Casa comercial
Cy3	ratón	1:300	Jackson Immunor.
Cy3	conejo	1:300	Jackson Immunor.
Cy5	ratón	1:300	Jackson Immunor.
Cy5	conejo	1:300	Jackson Immunor.
Alexa 488	conejo	1:300	Jackson Immunor.
Alexa 350	conejo	1:100	Jackson Immunor.
ToPro3		1:750	Invitrogen
Hoechst		2ug/ml	Molecular probes

Tabla 2. Listado de sondas TaqMan de Applied Biosystems.

Símbolo del gen	Sonda ID
<i>AADC</i>	Hs01105042_m1
<i>CHRM3</i>	Hs00265216_s1
<i>CHRM5</i>	Hs00255278_s1
<i>DBH</i>	Hs00168025_m1
<i>DRD2</i>	Hs00241436_m1
<i>EN1</i>	Hs00154977_m1
<i>GABAAα3</i>	Hs00968132_m1
<i>GABABR1</i>	Hs00961678_g1
<i>GLUR2</i>	Hs00356062_m1
<i>GTPCH</i>	Hs00609198_m1
<i>KCNJ6 (GIRK2)</i>	Hs00158423_m1
<i>LMX1B</i>	Hs00158750_m1
<i>MASH1</i>	Hs00269932_m1
<i>MSX1</i>	Hs00427183_m1
<i>NEUROGENINA2</i>	Hs00702774_s1
<i>NMDAR2A (GRIN2)</i>	Hs01058345_m1
<i>NR4A2</i>	Hs00428691_m1
<i>OTX2</i>	Hs00222238_m1
<i>PAX6</i>	Hs00240871_m1
<i>PITX3</i>	Hs00374504_m1
<i>SLC6A3 (DAT)</i>	Hs00168988_m1
<i>SOX2</i>	Hs01053049_s1
<i>TH</i>	Hs00165941_m1
<i>VMAT2</i>	Hs00161858_m1

Tabla 3. Anticuerpos utilizados en Wester blot.

Anticuerpos Primarios		Dilución	Casa comercial
Anti Cav 2.1	pAc	1:300	Alomone labs
Anti Cav 2.2	pAc	1:300	Alomone labs
Anti hCav 1.2	pAc	1:500	Alomone labs
Anti-Kv 3.4	pAc	1:300	Alomone labs
Anti-Pan Nav	pAc	1:300	Alomone labs
Calbindina	mAc	1:200	Sigma
Calretinina	pAc	1:1000	Chemicon
Calnexina	pAc	1:1000	Millipore
DAT	mAc	1:500	Chemicon
DRD2	pAc	1:500	Millipore
GABABR1	pAc	1:500	Alomone labs
GIRK2	pAc	1:100	Alomone
GluR 2/3	pAc	1:500	Millipore
NMDAR2A	pAc	1:500	Alomone labs
Parvalbúmina	pAc	1:1000	Millipore
VMAT2	pAc	1:500	Chemicon
β -actina	mAc	1:5000	Chemicon

Tabla 4. Anticuerpos usados en IHC.

Anticuerpos Primarios		Dilución	Casa comercial
DCX	pAC	1:1000	Sta.Cruz
GFAP	pAc	1:1000	DAKO
hGFAP	mAc	1:1000	Sigma
Nestina	pAc	1:1000	Abcam
Núcleo humano	mAc	1:100	Chemicon
TH	pAc	1:1000	Chemicon
β -Tubulina III	pAc	1:1000	Sigma

Anticuerpos Secundarios		Dilución	Casa comercial
Alexa 350	conejo	1:100	Jackson Immunor.
Alexa 488	conejo	1:300	Jackson Immunor.
BA1000	conejo	1:250	Vector lab.
BA2001	ratón	1:250	Vector lab.
BA6000	cabra	1:200	Vector lab.
Cy3	ratón	1:300	Jackson Immunor.
Cy3	conejo	1:300	Jackson Immunor.
Cy5	ratón	1:300	Jackson Immunor.
Cy5	conejo	1:300	Jackson Immunor.
estreptavidina Cy3		1:300	Jackson Immunor.
Hoechst		2ug/ml	Molecular probes
ToPro3		1:750	Invitrogen

RESULTADOS

RESULTADOS

1. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA, ESTUDIOS DE MADURACIÓN Y FUNCIONALIDAD EN LAS LÍNEAS hVM1 Y hVM1 high BCL-X_L.

I. Regionalización mesencefálica de las células estudiadas.

El primer aspecto que se quiso estudiar fue el carácter mesencefálico de las neuronas dopaminérgicas generadas a partir de los cultivos de células hVM1. Para ello se estudiaron los niveles de expresión génica mediante Q-RT-PCR de factores de transcripción típicos de la región mesencefálica (como *Engrailed 1* (*EN1*) necesario durante el desarrollo del sistema nervioso para la correcta formación de la banda cerebro medio-posterior y para la correcta maduración tardía de las neuronas dopaminérgicas (Abeliovich and Hammond, 2007; Prakash and Wurst, 2006)) en comparación con genes típicos de cerebro anterior (como *Paired box gen 6* (*PAX6*) implicado en el desarrollo del ojo en el telencéfalo dorsal (Manuel and Price, 2005)). La expresión de estos genes es imprescindible para que cada región adquiriera las propiedades básicas de los tejidos que allí se generarán. Asimismo, se estudiaron los principales genes asociados con el fenotipo dopaminérgico (*Tiroxina hidroxilasa* (*TH*), el transportador de dopamina (*DAT*) y el canal rectificador de potasio acoplado a proteínas G (*GIRK2*)). Estos estudios se realizaron en células hNS1 (originarias de cerebro anterior, (Villa et al., 2000)) y en células hVM1 durante la división y la diferenciación de los cultivos. Los datos obtenidos muestran la expresión relativa de cada gen analizado respecto de su valor en las muestras hNS1 en división. Como se observa en la figura 1, se puede distinguir dos patrones de expresión totalmente diferentes para todos los genes estudiados según el origen de las células. Observamos como *PAX6* está significativamente más expresado en las células hNS1, siendo muy baja su expresión en las células derivadas de mesencéfalo ventral. De forma *inversa* *EN1*, *TH*, *DAT* y *GIRK2* se encuentran significativamente más expresados en las células hVM1, siendo muy bajos o nulos sus niveles de expresión en las células hNS1. Los resultados obtenidos en las células hVM1 en el caso de *EN1* y *GIRK2*, corroboran firmemente su identidad como células procedentes de la región del mesencéfalo ventral. La mayor expresión de *TH*, *DAT* o *GIRK2* en hVM1 nos indica que esta línea celular es capaz de expresar genes característicos del fenotipo

dopaminérgico maduro, que no se encuentran en otras zonas del cerebro como el cerebro anterior.

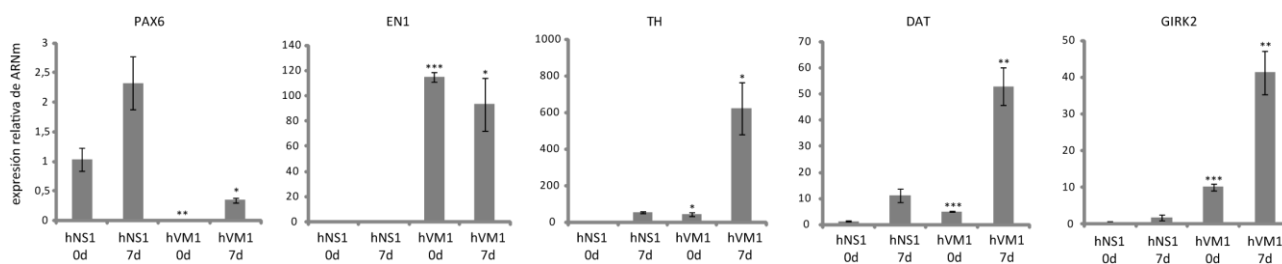


Fig. 1. Análisis de la expresión relativa de genes implicados en regionalización del sistema nervioso central y diferenciación dopaminérgica de las células hNS1 y hVM1. Mediante ensayos de Q-RT-PCR con sondas TaqMan se estudiaron los niveles de expresión relativa del ARNm de los genes PAX6, EN1, TH, DAT y GIRK2 en cultivos de células hNS1 y hVM1 en proliferación y diferenciados 7d. Los valores obtenidos para cada gen y muestra celular están corregidos por la expresión de GAPDH (utilizado como control endógeno) y están referidos en cada caso al valor de expresión de la muestra utilizada como calibradora (hNS1 en división). Mediante el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ se calculó la expresión relativa de cada gen en cada línea celular respecto de su valor en hNS1 a 0d. Los experimentos se llevaron a cabo realizando triplicados biológicos y técnicos y se expresan como media \pm ESM (* diferente en hVM1 frente a hNS1 a igual día en cultivo; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; t-test).

Tras la expresión forzada de Bcl- X_L en las células hVM1 (ver más adelante) y su expansión durante un prolongado tiempo *in vitro*, se mantiene el patrón de expresión de genes observado en hVM1, lo que indica que esta línea celular recuerda su origen mesencefálico.

En segundo lugar y una vez confirmada la regionalización de estas líneas celulares, estábamos interesados en conocer la expresión de proteínas de unión a calcio intracelular como calretinina, calbindina y parvalbúmina en los cultivos celulares de hVM1. Diversos estudios se han centrado en conocer la expresión de estas proteínas en la región dopaminérgica del cerebro medio, observando diferencias en su expresión en las distintas regiones que lo conforman (A8, A9 y A10) y también entre las diferentes especies en las que han sido estudiadas (McRitchie et al., 1996). La distribución de las proteínas de unión de calcio en la región de cerebro medio en humanos seguiría el patrón que se describió en el apartado 2, figura 3 de la Introducción. Tras estudiar la expresión de CALBINDINA, CALRETININA Y PARVALBÚMINA en cultivos diferenciados de 7 a 12d de células hVM1 y hVM1 high Bcl- X_L podemos decir que en ellos únicamente se detecta la expresión de calretinina (figura 2 a y b). Estudios previos realizados en secciones de cerebro humano (McRitchie et al., 1996) describen que en la parte dorsal y ventral de la SN pars compacta hay una elevada expresión de calretinina, muy escasa de parvalbúmina y nula de calbindina, siendo el total de las neuronas TH positivas de esta región CALRETININA positivas. Estos estudios junto con los resultados

obtenidos al analizar nuestros cultivos indicarían que las neuronas dopaminérgicas que se generan a partir de los cultivos de hVM1 y hVM1 high Bcl-X_L tienen una diferenciación a nivel de expresión de proteínas de unión a calcio intracelular similar a las que se encuentran en la SN pars compacta dorsal y ventral (grupo A9).

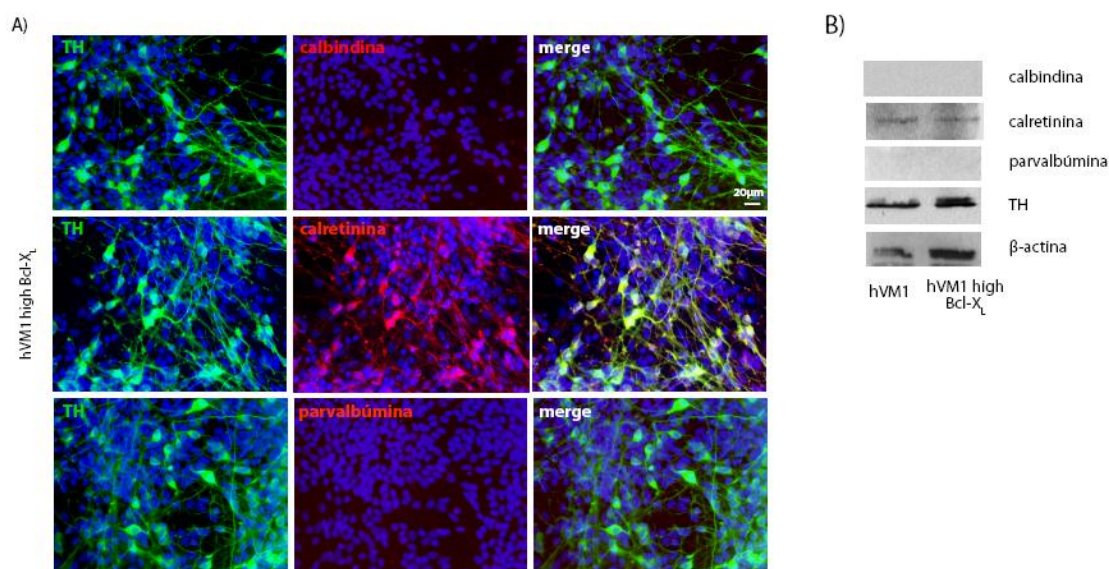


Fig. 2. Estudios de expresión de las proteínas de unión a calcio (calbindina, calretinina y parvalbúmina) en las líneas celulares hVM1 y hVM1 high Bcl-X_L.

A) Panel que muestra las imágenes resultantes de los ensayos inmunocitoquímicos para la tinción contra calbindina, calretinina y parvalbúmina, junto con TH, en las células hVM1 high Bcl-X_L diferenciados 7d. Únicamente encontramos expresión de la proteína calretinina en estas células, que co-localiza perfectamente con la tinción para TH.

B) Estudio mediante *western blot* de la expresión de calbindina, calretinina, parvalbúmina y TH en las líneas celulares hVM1 y hVM1 high Bcl-X_L tras 12d de diferenciación, a partir de extractos de proteína total. Como se puede observar sólo calretinina (además de TH) tienen niveles detectables en ambas líneas celulares. La expresión de β-actina se utilizó como control de carga del experimento.

Las células hVM1 y hVM1 high Bcl-X_L recuerdan por tanto su origen mesencefálico tras su immortalización y expansión *in vitro*. Según su patrón de expresión de proteínas de unión a calcio intracelular, podemos afirmar que diferencian como las neuronas dopaminérgicas de la SN pars compacta dorsal y ventral (grupo A9), cuyo fenotipo detallado será objeto de estudio en esta tesis.

II. Perfil fenotípico de las células derivadas de mesencéfalo ventral.

Una vez confirmadas las características fenotípicas básicas (descritas en la Introducción) de las líneas celulares hVM1 (a pase bajo 9-11) y hVM1 high Bcl-X_L (pases 25-30) y sabiendo que a estos pases generan igual porcentaje de neuronas *in vitro* (20%) tras su

diferenciación y que son capaces de expresar algunos de los genes típicos del mesencéfalo ventral, comenzamos un análisis en profundidad de la expresión en ambas líneas celulares de aquellos genes relacionados típicamente con: i) regionalización del tubo neural (concretamente del cerebro medio) y aparición de los precursores neuronales; ii) adquisición del fenotipo propiamente dopaminérgico y de otros tipos neuronales de la región mesencefálica; iii) procesos de maduración y funcionalidad neuronal.

Para estos estudios se recurrió tanto a la técnica de PCR cuantitativa a tiempo real (Q-RT-PCR), ya que permite obtener unos resultados precisos para poder observar pequeños cambios en la expresión de un gen, como a ensayos de inmunocitoquímica y/o western blot para comprobar los niveles de las proteínas cuyo ARNm fue previamente analizado. Mediante Q-RT-PCR estudiamos: 1) **El patrón de expresión temporal del ARNm de cada gen analizado.** Cada línea celular se estudió por separado, tomando como muestra de referencia para las comparaciones relativas de expresión de cada gen el día 0 de diferenciación de cada línea celular. De esta forma podemos comprobar el patrón de expresión temporal de cada gen de manera independiente en cada línea celular, y determinar si evolucionan en el tiempo de manera similar o por el contrario existen diferencias entre hVM1 y hVM1 high Bcl-X_L. Los valores obtenidos con este primer análisis no permiten comparaciones entre los niveles de expresión de las dos líneas celulares porque parten de muestras calibradoras distintas. 2) **Los niveles de expresión de una línea celular respecto de la otra.** Para ello se tomó una única muestra calibradora (las células hVM1 a día 0) refiriendo el nivel de expresión de los genes analizados en el resto de muestras respecto de su valor en ella. Esto nos permite calcular el *ratio* de expresión hVM1 high Bcl-X_L/hVM1 para cada gen estudiado (mayor, igual o menor en hVM1 high Bcl-X_L respecto de la línea hVM1 en cada día analizado según su *ratio* fuese >1, =1 ó <1 respectivamente). 3) **Los niveles de expresión de un gen respecto del valor obtenido para TH en ese mismo día y línea celular.** Para ello se calculó el *ratio* del Avg Δ Ct gen/Avg Δ Ct TH para cada gen, línea celular y día estudiado. De esta manera averiguamos si la expresión de un gen determinado es mayor, menor o igual a la de TH y su evolución con los días de diferenciación.

a) Genes relacionados con organización del tubo neural y presencia de progenitores neuronales.

En primer lugar se analizó la expresión de aquellos genes que tienen relevancia en la regionalización del tubo neural y el desarrollo del cerebro medio (*OTX2*, *SOX2* y *EN1*) y la

aparición de los progenitores neuronales (*NEUROGENINA2*, *MASH1* y *MSX1*) (Abeliovich and Hammond, 2007; Burbach and Smidt, 2006; Nelander et al., 2009; Prakash and Wurst, 2006; Yi et al., 2008)

OTX2 es un factor de transcripción necesario para el correcto establecimiento del límite cerebro medio-posterior. Además, reprime en esta zona la expresión de *Nkx2.2* impidiendo que se desarrollen en la región del mesencéfalo ventral neuronas serotoninérgicas. *EN1* es un gen que comienza a expresarse muy pronto durante el desarrollo y es imprescindible para la correcta formación de la región medio-posterior del cerebro y la supervivencia y el mantenimiento a largo plazo de las neuronas dopaminérgicas.

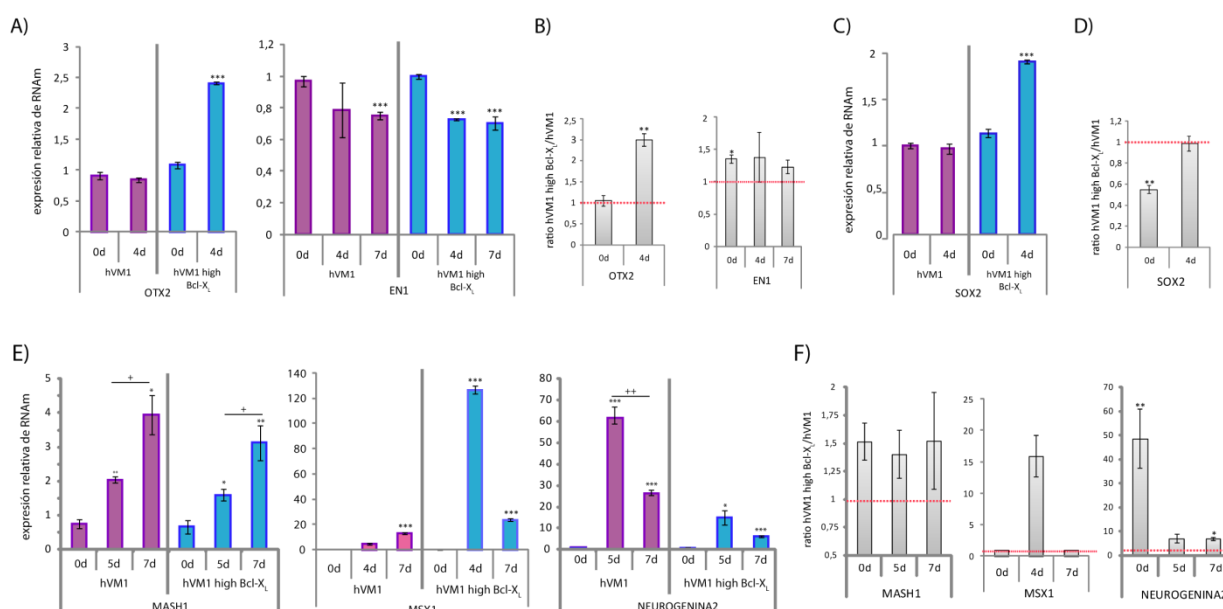


Fig. 3. Estudio de expresión de genes relacionados con la organización y especificación del tubo neural y la presencia de progenitores neuronales en las células hVM1 y hVM1 high Bcl-X_L. Mediante Q-RT-PCR estudiamos tanto el patrón temporal de expresión relativa (A, C, E) como los niveles de expresión de cada gen en una línea celular respecto de la otra (B, D y F) de los genes *OTX2*, *EN1*, *SOX2*, *MASH1*, *MSX1* y *NEUROGENINA2*. En el caso del patrón de expresión temporal del ARNm de cada gen analizado, cada línea celular se estudió por separado, tomando como muestra de referencia para las comparaciones relativas de expresión de cada gen el día 0 de diferenciación de cada línea celular. De esta forma podemos comprobar el patrón de expresión temporal de cada gen de manera independiente en cada línea celular, y determinar si evolucionan en el tiempo de manera similar o por el contrario existen diferencias entre hVM1 y hVM1 high Bcl-X_L. Los valores obtenidos con este primer análisis no permiten comparaciones entre los niveles de expresión de las dos líneas celulares porque parten de muestras calibradoras distintas. Para estudiar los niveles de expresión de una línea celular respecto de la otra, se tomó una única muestra calibradora (las células hVM1 a día 0) refiriendo el nivel de expresión de los genes analizados en el resto de muestras respecto de su valor en ella. Esto nos permite calcular el *ratio* de expresión hVM1 high Bcl-X_L/hVM1 para cada gen estudiado (mayor, igual o menor en hVM1 high Bcl-X_L respecto de la línea hVM1 en cada día analizado según su *ratio* fuese >1, =1 ó <1 respectivamente). Los datos representan la media ± ESM (n=3), *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; t-test.

A y C) * significativamente distinto de su valor en la misma línea celular entre 0 y 4d.

E) * significativamente distinto a su valor en la misma línea celular a 0d; + significativamente distinto de su valor en la misma línea celular entre 5 y 7d.

B, D y F) * significativamente distinto de 1.

Como se observa en la figura 3a los niveles de *OTX2* permanecen constantes entre 0 y 4d en las células hVM1, mientras que existe un patrón temporal de aumento de su expresión hasta los 4d de diferenciación en las células hVM1 high Bcl-X_L. Al estudiar *EN1* observamos una disminución de su expresión durante la diferenciación en ambas líneas celulares. Cuando nos fijamos en los ratios de expresión de estos dos genes (figura 3b) vemos que tras 4d de diferenciación existe una mayor expresión de *OTX2* en las células hVM1 high Bcl-X_L. En el caso de *EN1* las diferencias detectadas a 0d desaparecen tras 4d de diferenciación.

SOX2 es un factor de transcripción necesario para mantener a los progenitores neuronales en un estado proliferativo. Muestra una expresión sin cambios entre 0 y 4d en las células hVM1 (ver figura 3c), mientras que en las hVM1 high Bcl-X_L se incrementan sus niveles de expresión tras 4d de diferenciación. Si nos centramos en los ratios de expresión (figura 3d) vemos como hay una menor expresión de *SOX2* en las hVM1 high Bcl-X_L a 0d que termina igualándose a los niveles de las hVM1 tras 4d de diferenciación.

Al centrarnos en genes relacionados con neurogénesis y especificación dopaminérgica temprana, se estudiaron genes como *MASH1*, *NEUROGENINA2* Y *MSX1*. La expresión de estos genes está relacionada entre sí, y junto con otros promueven neurogénesis en los progenitores neuronales del cerebro medio, reprimen diferenciación glial y determinan la especificación espacio-temporal temprana de los progenitores que darán lugar a las futuras neuronas dopaminérgicas. En la figura 3e vemos como el patrón de expresión temporal de *MASH1* y *NEUROGENINA2* aunque diferente para cada gen, es similar entre las células hVM1 y hVM1 high Bcl-X_L. *MASH1* incrementa su expresión progresivamente con los días en diferenciación, mientras que *NEUROGENINA2* presenta un pico en su expresión a los 5d en ambas líneas celulares que disminuye significativamente a los 7d de diferenciación. Al estudiar los ratios hVM1 high Bcl-X_L/hVM1 (figura 3f) vemos que no hay diferencias en la expresión de *MASH1* durante la diferenciación entre las dos líneas celulares. Sin embargo, en el caso de *NEUROGENINA2* observamos que su expresión es mayor en las células hVM1 high Bcl-X_L a 0 y 7d pero no así durante el pico de alta expresión a los 5d de diferenciación, lo que coincide en el tiempo con el momento de aparición de las neuronas en estos cultivos (ver resultados previos, (Courtois et al., 2010; Villa et al., 2009). La expresión de *NEUROGENINA2* está relacionada con la salida de ciclo celular de los progenitores neuronales y se cree que colabora con *NURR1* para que los progenitores TH positivos puedan madurar correctamente (Andersson et al., 2007; Kele et al., 2006; Roybon et al., 2008). Por último, en el caso de *MSX1* la tendencia a aumentar con la diferenciación se observa en las células hVM1, pero en las hVM1 high Bcl-X_L tras un brusco incremento a 4d los niveles descienden drásticamente a los 7d de diferenciación. *MSX1* bloquea a *NKX6.1* impidiendo que los progenitores neuronales inicien

rutas de diferenciación hacia otros fenotipos distintos. Este patrón temporal de aumento de expresión génica sobre el cuarto día de diferenciación concuerda con el pico de *NEUROGENINA2* observado a 5d.

En conclusión hasta este punto se puede afirmar que las dos líneas celulares estudiadas derivadas de mesencéfalo ventral conservan *in vitro* la expresión de genes como *OTX2*, y *EN1*, muy importantes en la regionalización del cerebro medio durante el desarrollo del sistema nervioso para que esa región del tubo neural vaya adquiriendo las propiedades típicas del tejido mesencefálico. Además, tanto la línea hVM1 como la hVM1 high Bcl-X_L expresan genes relacionados con la aparición de progenitores neuronales (*SOX2*, *MASH1*, *MSX1* y *NEUROGENINA2*). Las diferencias observadas en los niveles de expresión *NEUROGENINA 2* en las células hVM1 high Bcl-X_L respecto de las hVM1 nos indicarían la existencia de diferencias en la población de progenitores neuronales durante la diferenciación de los cultivos entre ambas líneas celulares, aspecto discutido más adelante en esta memoria.

b) Genes implicados en la adquisición del fenotipo dopaminérgico.

Al estudiar específicamente el sistema dopaminérgico es necesario analizar los factores de transcripción que se expresan en la región del cerebro medio, y que, actuando en forma de cascada, hacen que los progenitores neuronales adquieran un compromiso de diferenciación hacia neurona dopaminérgica (*LMX1b*, *NURR1*, *PITX3* (Burbach and Smidt, 2006) y también en aquellos genes relacionados con la ruta de síntesis de la dopamina (*TH*, *AADC* y *GTPCH*) (Goridis and Rohrer, 2002; Jacobs et al., 2007; Prakash and Wurst, 2006).

Cuando nos centramos en los factores de transcripción se observa que, conforme avanza la diferenciación, los niveles de ARNm de *LMX1b*, *NURR1* y *PITX3* aumentan con el transcurso de los días en cultivo (ver figura 4a). Los progenitores neuronales *EN1* y *NEUROGENINA2* positivos comienzan su compromiso de diferenciación hacia neurona dopaminérgica. El siguiente paso es la activación secuencial de la expresión de genes como *MSX1*, *LMX1b* y *NURR1*, y la activación de la expresión de *PITX3*, el cuál determina la expresión del enzima *TH* y la correcta activación de otros genes relacionados con el fenotipo maduro de estas neuronas. Tanto en las células hVM1 como hVM1 high Bcl-X_L vemos como la expresión de *LMX1b* y *NURR1* aumenta con los días en cultivo, encontrando su máxima expresión a día 7. Al estudiar *PITX3* vemos como aumenta su expresión en las células hVM1 high Bcl-X_L durante la

diferenciación, mientras que en las células hVM1 hay un descenso significativo en la expresión de este gen a 4d que se restablece tras 7d de diferenciación. La expresión de *NURR1* y *PITX3* inicia una etapa en la que los progenitores dopaminérgicos ya comprometidos se vuelven postmitóticos y comienzan a diferenciarse y a expresar el enzima *TH*. Ambos factores se mantienen posteriormente para asegurar la supervivencia de estas neuronas dopaminérgicas. Recientemente se ha demostrado que *Pitx3* es esencial a la hora de rescatar a *Nurr1* de su estado reprimido, el cual modula la expresión de genes relacionados con el fenotipo dopaminérgico maduro (Jacobs et al., 2009). Como se muestra en la figura 4a, la expresión de *TH* en ambas líneas celulares comienza a los 4d y aumenta según avanza la diferenciación, lo que coincide con los patrones de expresión esperados y observados por los factores de transcripción.

Al analizar los *ratios* hVM1 high Bcl-X_L/hVM1 (figura 4b), la mayoría de los genes se encuentran sobre-expresados en las hVM1 high Bcl-X_L a los 7d de diferenciación.

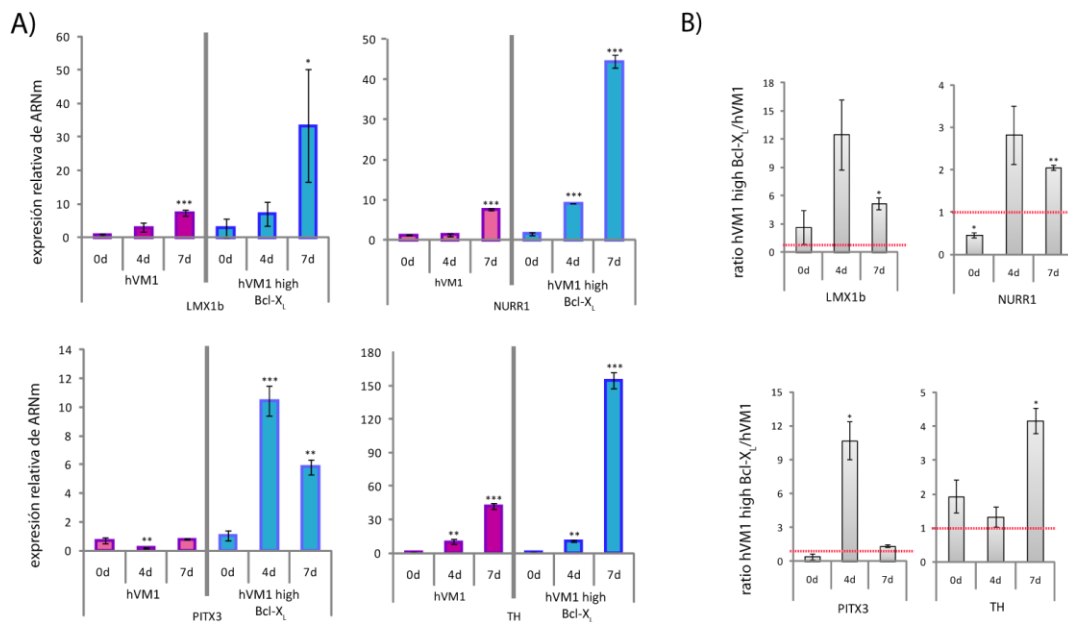


Fig. 4. Estudio de expresión de los factores de transcripción relacionados con la adquisición el fenotipo dopaminérgico en células hVM1 y hVM1 high Bcl-X_L en división y diferenciadas 4 y 7d. Mediante Q-RT-PCR estudiamos tanto el patrón temporal de expresión relativa (A) como los niveles de expresión de cada gen en una línea celular respecto de la otra (B) de los genes *LMX1b*, *NURR1*, *PITX3* y *TH*. Los datos representan la media \pm ESM (n=3), *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; t-test.

A) * significativamente distinto a su valor en la misma línea celular a 0d.

B) * significativamente distinto de 1.

Podemos concluir hasta este punto que ambas líneas celulares expresan los genes necesarios para la especificación dopaminérgica de los progenitores neuronales y para la

generación de neuronas con el fenotipo dopaminérgico de tipo A9, siendo mayor la expresión de *LMX1b*, *NURR1*, *PITX3* y *TH* en las células hVM1 high Bcl-X_L.

c) Genes responsables del fenotipo dopaminérgico.

A partir del día 7 de diferenciación (ya se expresan *NURR1*, *PITX3* y *TH*) se observa (figura 5a) cómo la expresión de *AADC* (decarboxilasa de L-aminoácidos aromáticos, enzima que convierte L-Dopa en dopamina) aumenta en ambas líneas celulares según progresa la diferenciación de los cultivos. El aumento en la expresión de *GTPCH* (GTP ciclohidroxilasa 1, primer enzima en la ruta de síntesis de la tetrahidrobiopterina, un cofactor esencial para TH en la síntesis de dopamina) en la línea hVM1 durante la diferenciación, no se observa en las células hVM1 high Bcl-X_L, en las cuales su expresión se mantiene constante a lo largo de la diferenciación.

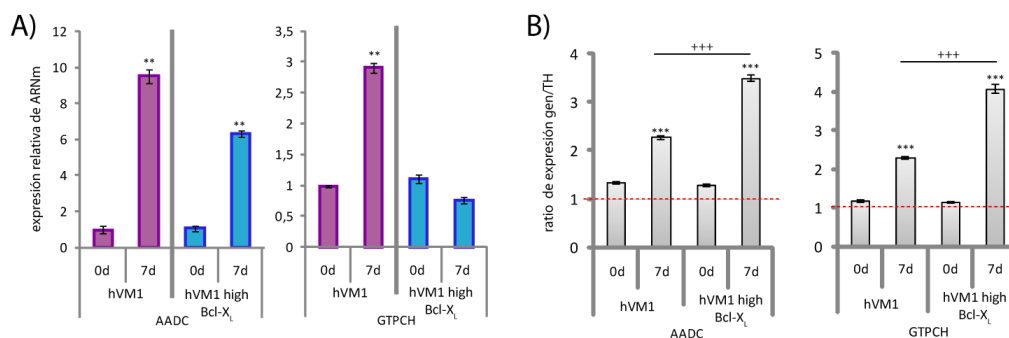


Fig. 5. Estudio de expresión de las enzimas responsables de la adquisición el fenotipo dopaminérgico en células hVM1 y hVM1 high Bcl-X_L en división y diferenciadas 7d. Mediante Q-RT-PCR estudiamos tanto el patrón temporal de expresión relativa (A) como los niveles de expresión de un gen respecto del valor obtenido para TH en ese mismo día y línea celular (B) de los genes *AADC* y *GTPCH*. Para calcular la expresión de un gen respecto del valor obtenido para TH, se calculó el ratio del Avg Δ Ct gen/Avg Δ Ct TH para cada gen, línea celular y día estudiado. De esta manera averiguamos si la expresión de un gen determinado es mayor, menor o igual a la de TH y su evolución con los días de diferenciación. Los datos representan la media \pm ESM (n=3), *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; t-test.

A) * significativamente distinto a su valor en la misma línea celular a 0d.

B) * significativamente distinto de 1; + significativamente distinto entre las dos líneas celulares a igual día de diferenciación.

Si analizamos la expresión de cada gen en función de la expresión de TH en las dos líneas celulares y pada cada día estudiado (figura 5b) observamos que hay una mayor expresión de *AADC* y *GTPCH* que de *TH* tras 7d de diferenciación en ambas líneas celulares. Existen diferencias significativas entre hVM1 high Bcl-X_L y hVM1, mostrando las hVM1 high Bcl-X_L tras 7d de diferenciación una mayor expresión de estos tres genes en las células TH positivas, lo cual indicaría un mayor carácter dopaminérgico para un nivel determinado de *TH*.

Es importante resaltar que en este estudio se incluyó la sonda para la detección de DBH (dopamina β -hidroxilasa), enzima que cataliza el cambio de la dopamina en noradrenalina, no encontrándose expresión en ninguna de las dos líneas celulares. Podemos decir por tanto que las células TH positivas encontradas no son noradrenérgicas, y que dicha dopamina no es posteriormente modificada para la síntesis de otras catecolaminas. Esto concuerda con su naturaleza de neuronas dopaminérgicas de tipo A9.

d) Genes relacionados con la maduración funcional de las neuronas dopaminérgicas.

Una vez estudiados los genes implicados en la especificación regional y la adquisición del fenotipo dopaminérgico nos centramos en aquellos genes relacionados con la maduración y la funcionalidad de este tipo de neuronas. Para ello se estudió la expresión tanto del enzima TH, como del transportador de dopamina (DAT), el transportador vesicular de monoaminas (VMAT2), el receptor de dopamina tipo 2 (DRD2) y el canal rectificador de potasio acoplado a proteínas G (GIRK2) a 0, 12 y 30 días de diferenciación “in vitro” en ambas líneas celulares.

Al estudiar el patrón temporal de expresión de *TH* (figura 6a) observamos cómo aumenta significativamente con la diferenciación hasta día 12 en las hVM1, para descender tras 30d de diferenciación. En el caso de hVM1 high Bcl-X_L el pico de expresión de *TH* se encuentra a los 7d, disminuyendo significativamente después hasta alcanzar valores estables que se mantienen hasta los 30d de diferenciación. Si analizamos el *ratio* hVM1 high Bcl-X_L/hVM1 observamos una mayor cantidad de *TH* en la línea hVM1 high Bcl-X_L tras 30d de diferenciación. Cuando estudiamos el patrón de expresión de esta proteína durante la diferenciación (mediante inmunocitoquímica) observamos que el porcentaje de células TH positivas (tabla 1) tienen una distribución similar a lo observado a nivel de ARNm en ambas líneas celulares respecto del número total de células del cultivo:

	hVM1	hVM1 high Bcl-X _L
7 días	10,44 \pm 0,81	18,98 \pm 0,75
12 días	11,34 \pm 0,75	16,61 \pm 1,32*
30 días	8,06 \pm 0,43*+	16,15 \pm 0,70*

Tabla 1. Porcentaje de células TH positivas frente al número total de células presentes en cultivos de las dos líneas celulares tras 7, 12 y 30d de diferenciación. Los porcentajes se obtuvieron a partir de experimentos realizados por triplicado, en los que se contaron al menos 5 campos por cubre, y se expresan como la media \pm SEM (*p<0,05, ANOVA, Tukey's test); * estadísticamente significativo respecto de 7d; + estadísticamente significativo respecto a 12d.

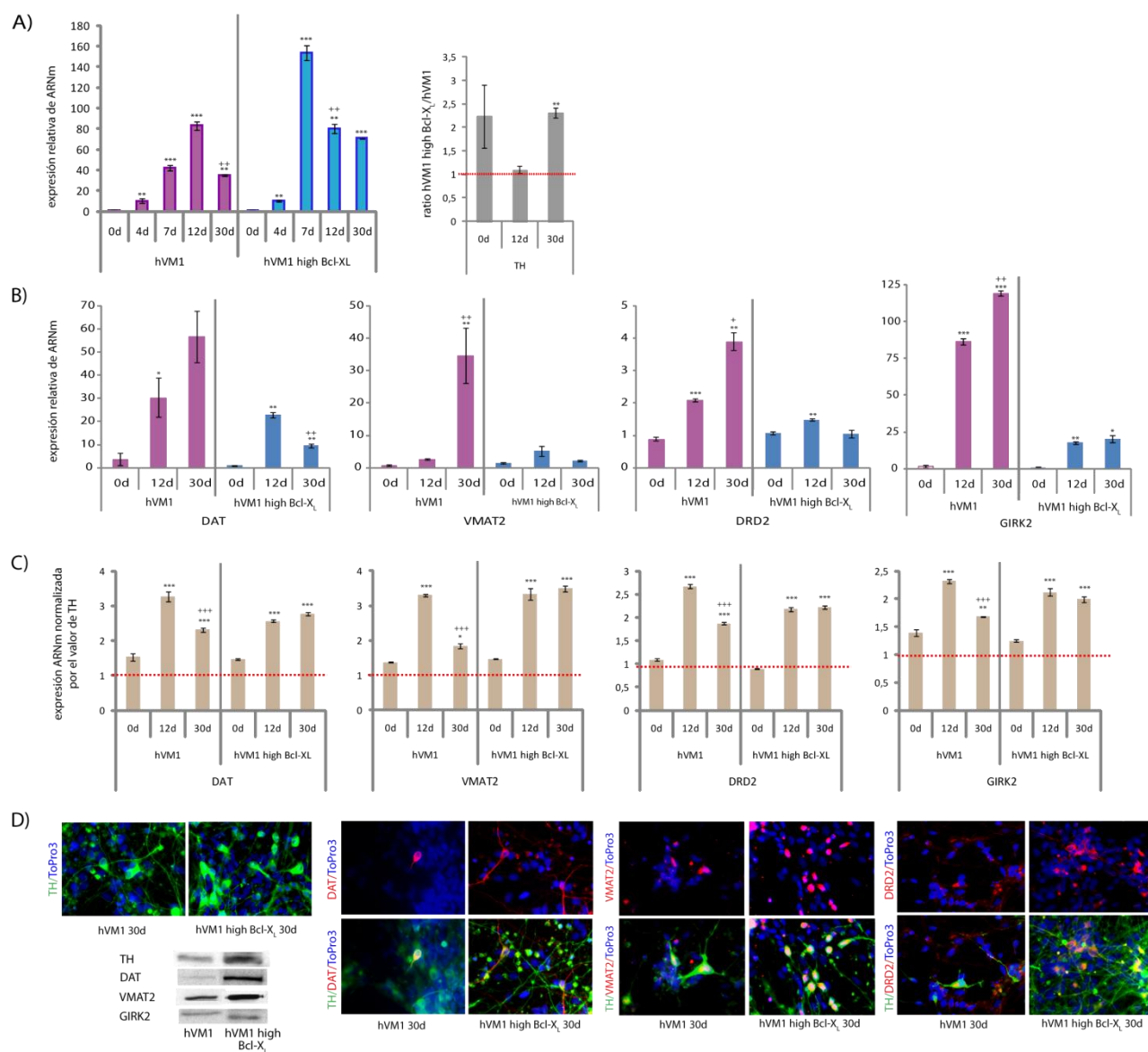


Fig. 6. Estudio de expresión de genes relacionados con la maduración funcional de las neuronas dopaminérgicas en células hVM1 y hVM1 high Bcl-X_L en división y diferenciadas hasta 30d. Mediante Q-RT-PCR estudiamos tanto el patrón temporal de expresión relativa (A y B) como los niveles de expresión de un gen respecto del valor obtenido para TH en ese mismo día y línea celular (C) de TH, DAT, VMAT2, DRD2 y GIRK2. Los datos representan la media \pm ESM (n=3), *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; t-test.

A y B) * significativamente distinto a su valor en la misma línea celular a 0d; + significativamente distinto en la misma línea celular entre 12 y 30d. En el caso del ratio hVM1 high Bcl-X_L/hVM1 para TH * significativamente distinto de 1.

D) Estudio de la expresión de las proteínas TH, DAT, VMAT2 y DRD2 mediante inmunocitoquímica y western blot, en las neuronas dopaminérgicas (TH⁺) generadas en cultivos de células hVM1 y hVM1 high Bcl-X_L diferenciados durante 30d.

A los 30d de diferenciación a igual número de neuronas β -III-Tubulina positivas generadas en cultivo, el porcentaje de células TH positivas en la línea hVM1 high Bcl-X_L es el doble que las hVM1, concordando estos datos con lo observado al estudiar los ratios de expresión del gen mediante Q-RT-PCR.

Entender el patrón temporal de generación de neuronas TH positivas mediante inmunocitoquímica y Q-RT-PCR facilitará la puesta en contexto de los datos de expresión de otros genes relacionados con maduración funcional y que se describen a continuación.

Como podemos ver en la figura 6b el patrón temporal de expresión de los genes *DAT*, *VMAT2*, *DRD2* Y *GIRK2* es muy diferente para las dos líneas celulares.

En la línea hVM1 se observa un aumento gradual de la expresión de todos los genes estudiados hasta los 30d de diferenciación, mientras que en hVM1 high Bcl-X_L su expresión presenta un máximo a 12d para después descender (*DAT*, *DRD2*) o mantenerse sin cambios (*VMAT2*, *GIRK2*) hasta los 30d de diferenciación. Cuando se estudian los valores de expresión normalizados a los niveles de *TH* en cada línea celular y día analizado (figura 6c), vemos como en ambas líneas celulares la expresión de estos cuatro genes es mayor que la de *TH* pero se observan dos patrones muy diferentes. En las células hVM1 la expresión de los cuatro genes aumenta hasta los 12d de diferenciación y a partir de este momento disminuye, existiendo diferencias significativas entre los 12 y los 30d de diferenciación. En las células hVM1 high Bcl-X_L sin embargo no se observa esa disminución a partir del día 12 de diferenciación. Estos patrones temporales concuerdan con el de expresión de *TH* para cada línea celular.

Dada la importancia de estos genes, la presencia de estas proteínas en las células TH positivas fue comprobada en paralelo mediante estudios de *western blot* e inmunocitoquímica en cultivos de ambas líneas celulares a 30d de diferenciación (ver figura 6d), confirmándose una mayor expresión de *DAT*, *VMAT2*, *DRD2* y *GIRK2* en las células hVM1 high Bcl-X_L diferenciadas 30d que en las hVM1.

Las células hVM1 y hVM1 high Bcl-X_L diferenciadas durante 12-30d expresan los genes típicos y necesarios para la maduración funcional de neuronas dopaminérgicas (*DAT*, *VMAT2*, *DRD2* Y *GIRK2*), siendo su expresión variable dependiendo del día de diferenciación y el tipo celular. En general, podemos decir que en los cultivos de células hVM1 high Bcl-X_L existe una mayor expresión de los genes relacionados con la maduración de las células dopaminérgicas que se corresponde con un mayor porcentaje de células TH positivas originadas a partir de esta línea celular. Además, en las células hVM1 high Bcl-X_L las células TH positivas aparecen antes durante la diferenciación de los cultivos y estos genes indicativos de madurez presentan su máxima expresión a 12d, en comparación con hVM1 que proseguirá madurando durante los 30d de diferenciación estudiados. Sin embargo, al referir los *ratios* de expresión de estos genes a los niveles de *TH*, este análisis no indica si los dos tipos celulares presentan un distinto grado de maduración.

e) Estudio de otros fenotipos neuronales de mesencéfalo ventral.

A partir de los 12d de diferenciación se alcanza el número máximo de neuronas en el cultivo (figura 7). En las células hVM1 high Bcl-X_L las células β -III-Tubulina positivas representan el 20% del total del cultivo, sin sufrir variaciones a lo largo de la diferenciación. En los cultivos de células hVM1 sin embargo, podemos ver una disminución significativa en el número de células β -III-Tubulina positivas a los 20d de diferenciación. Este descenso en el porcentaje de neuronas a los 20d de diferenciación, podría estar asociado a la muerte celular que se observa durante la diferenciación del cultivo y que es mucho menor en el caso de las células hVM1 high Bcl-X_L. Una vez alcanzados los 30d de diferenciación los porcentajes de neuronas frente a células totales se restablecen en las células hVM1y vuelven a valores entorno al 20% del total de células del cultivo, similar al observado a los 12d.

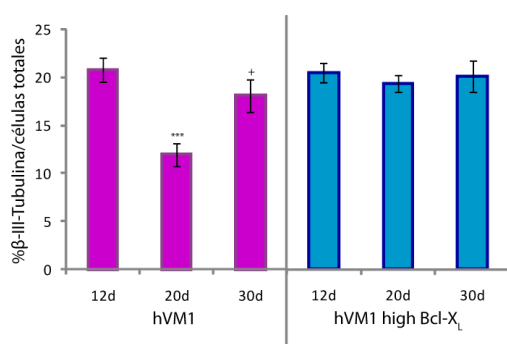


Fig. 7. Porcentaje de neuronas generado en los cultivos de células hVM1 y hVM1 high Bcl-X_L a 12, 20 y 30d de diferenciación. En ambas líneas celulares el número de neuronas frente a células totales está en torno al 21%. Mientras que dicho porcentaje de células β -III-Tubulina⁺ permanece constante desde los 12 a los 30d en las células hVM1 high Bcl-X_L, en la línea hVM1 se observa una disminución a 20d de

diferenciación para luego recuperarse tras 30d en cultivo. Los datos representan el valor medio \pm ESM de los conteos realizados para condición por triplicado, teniendo en cuenta al menos 5 campos por cubre. * $p < 0,05$, ANOVA, Tukey's test, donde * significativamente distinto de 12d; + significativamente distinto entre 20 y 30d.

Una vez analizado en profundidad el patrón de expresión de genes relevantes para la generación de neuronas dopaminérgicas en los cultivos de células hVM1 y hVM1 high Bcl-X_L, estuvimos interesados en estudiar la presencia de otros fenotipos neuronales típicos de la región mesencefálica cuya actividad es importante para el correcto funcionamiento del sistema nigroestriatal y de los ganglios basales, como son las neuronas gabaérgicas, serotoninérgicas y glutamatérgicas (Prensa et al., 2000; Waldvogel et al., 2004). Las neuronas generadas durante la diferenciación de estos cultivos son predominantemente dopaminérgicas en ambas líneas celulares. Esto es debido a su origen mesencefálico y se ve favorecido por los factores de crecimiento añadidos al medio de diferenciación. Al caracterizar en mayor profundidad estos cultivos, observamos la presencia en menor porcentaje de otros tipos

neuronales presentes en el sistema nigroestriatal, cuya expresión máxima se detecta tras 30d de diferenciación (figura 8 y tabla 2):

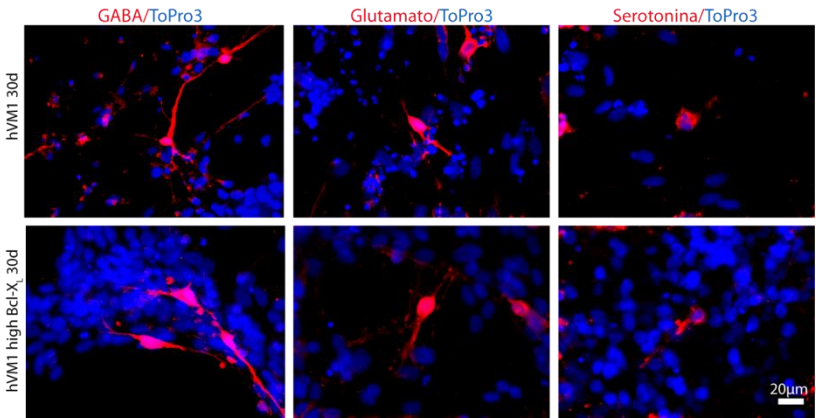


Fig. 8. Otros fenotipos neuronales presentes en las células hVM1 y hVM1 high Bcl-X_L diferenciados durante 30d. Imágenes de inmunofluorescencia que muestran en rojo como ambas líneas celulares presentan células positivas para los neurotransmisores GABA, glutamato y serotonina. Los núcleos se muestran en azul, aunque fueron teñidos utilizando ToPro3 (rojo lejano).

	Gabaérgicas	Glutamatérgicas	Serotoninérgicas
hVM1	4,05 ± 0,56	1,94 ± 0,26	< 0,1%
hVM1 high Bcl-X _L	4,28 ± 0,31	0,48 ± 0,20	< 0,1%

Tabla 2. Porcentaje de células positivas para otros neurotransmisores diferentes de la dopamina frente al número total de células presentes en cultivos de las dos líneas celulares tras 30d de diferenciación. Los porcentajes se obtuvieron a partir de experimentos realizados por triplicado, en los que se contaron al menos 5 campos por cubre, y se expresan como la media ± SEM.

Cabe destacar que ninguno de estos marcadores co-localiza con las células TH positivas encontradas en los cultivos de ambas líneas celulares, y que en total, el número de células TH, GABA y Glu positivas suman (en el caso de hVM1 high Bcl-X_L) un valor cercano al de las β -III-Tubulina totales. Esto indicaría que es improbable que exista algún tipo de neurona relevante en número en los cultivos que no haya sido estudiado. No se detectó la presencia de neuronas acetilcolina positivas en ninguna de las dos líneas celulares estudiadas.

f) Estudio de los receptores para otros neurotransmisores diferentes de la dopamina.

A continuación estudiamos la presencia en estas células de los principales receptores para los neurotransmisores que actúan en la vía nigroestriatal. Concretamente, las neuronas

dopaminérgicas situadas en la región de la Substancia Nigra poseen receptores para diversos neurotransmisores, tanto en el soma como en las dendritas, que *in vivo* son liberados por neuronas no dopaminérgicas situadas a lo largo del circuito de los ganglios basales (Substancia Nigra, núcleo subtalámico, globo pálido, estriado, tálamo, cortex) (Bustos et al., 2004; Meltzer et al., 1997; Mena-Segovia et al., 2008; Waldvogel et al., 2008; Waldvogel et al., 2004; Weiner et al., 1990). La presencia de receptores para neurotransmisores como GABA, glutamato o acetilcolina en las neuronas dopaminérgicas es importante, ya que modulan su actividad electrofisiológica y la liberación por tanto de dopamina al medio. En este caso estudiamos en nuestros cultivos celulares la expresión de receptores para los siguientes neurotransmisores: i) GABA (receptores para GABA tipo B $\alpha 1$ (GABA-B-R1) y tipo A $\alpha 3$ (GABA-A-R $\alpha 3$)); ii) Glutamato (receptor metabotrópico de glutamato 2 (GluR2) y receptor ionotrópico de glutamato NMDAR2A (GRIN2)); iii) Acetilcolina (receptor ionotrópico (CHRM3) y metabotrópico (CHRM5) de acetilcolina).

Como se puede ver en la figura 9a, y como sería de esperar, la expresión de los receptores para GABA y glutamato aumenta con la diferenciación en ambas líneas celulares, alcanzando sus máximos valores a los 30d. Los ratios de expresión para estos genes (figura 9b) son muy variables dependiendo del día de diferenciación, siendo mayor la expresión de *GABA-A-R $\alpha 3$* y *GLUR2* a 12d y *GABA-B-R1* y *NMDAR2A* a 30d en las hVM1 high Bcl-X_L respecto de hVM1. Además, se comprobó la expresión de las proteínas GABA-B-R1, GluR2-3 y NMDAR2A mediante inmunocitoquímica y *western blot* en los cultivos diferenciados 30d (ver figura 9c), observando una mayor expresión de las tres en la línea hVM1 high Bcl-X_L.

Cuando estudiamos el patrón temporal de expresión de los receptores colinérgicos observamos que (figura 9d y e) para *CHRM3* es similar en ambas líneas celulares, mientras que *CHRM5* aumenta con la diferenciación en hVM1 pero no en hVM1 high Bcl-X_L. Si nos centramos en los *ratios* de expresión vemos la expresión de CHRM3 es mayor en hVM1 high Bcl-X_L a 12d y 30d, mientras que CHRM5 tiene una mayor expresión en las hVM1 high Bcl-X_L a 12d pero no a los 30d de diferenciación.

RESULTADOS

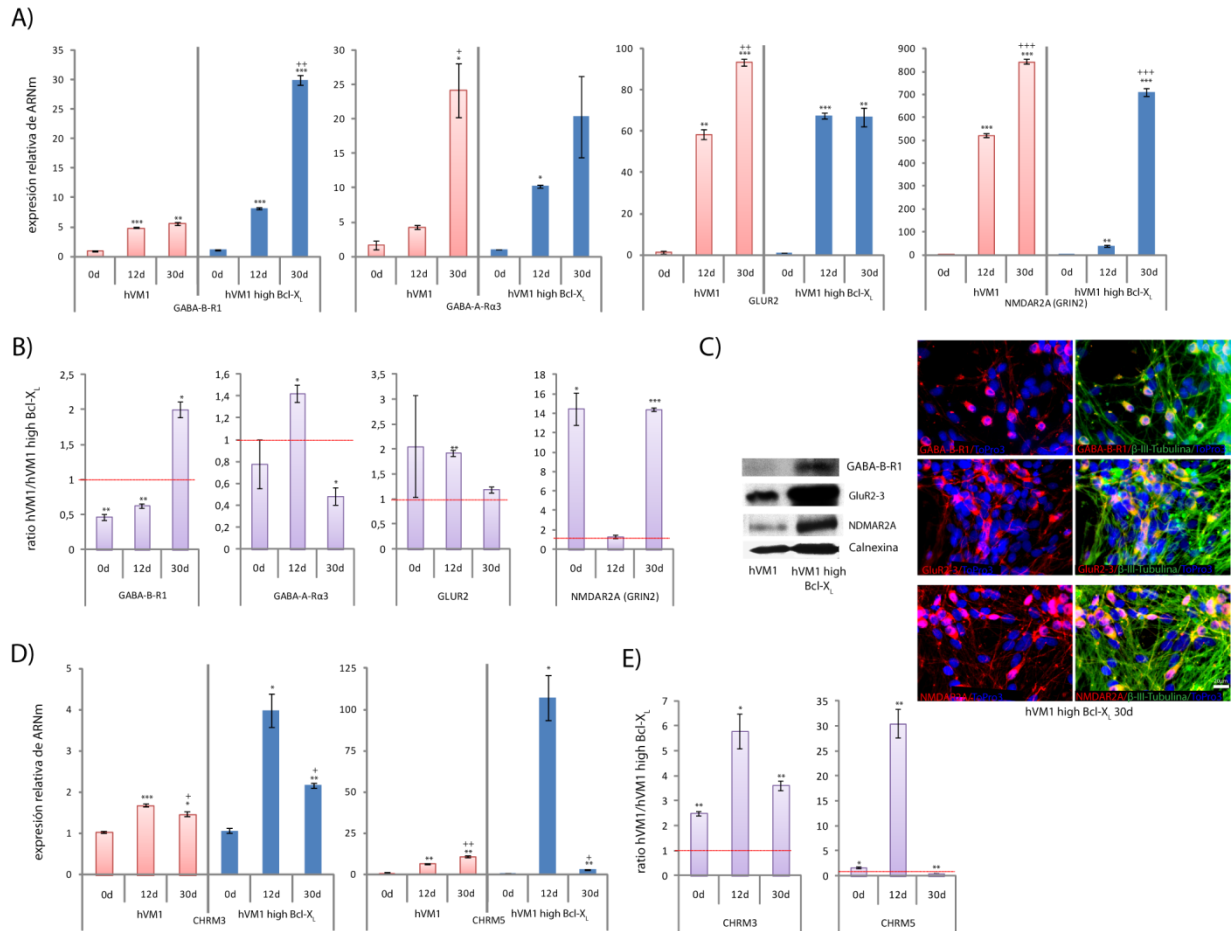


Fig. 9. Estudio de la expresión de otros receptores de neurotransmisores diferentes a la dopamina en células hVM1 y hVM1 high Bcl-X_L en división y diferenciadas 12 y 30d. Mediante Q-RT-PCR estudiamos tanto el patrón temporal de expresión relativa (A y D) como los niveles de expresión de cada gen en una línea celular respecto de la otra (B y E) de los genes que codifican para receptores de GABA (*GABA-B-R1* y *GABA-A-Ra3*), glutamato (*GLUR2* y *GRIN2A*) y acetilcolina (*CHRM3* y *CHRM5*). Los datos representan la media \pm ESM (n=3), *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; t-test.

A y D) * significativamente distinto a su valor en la misma línea celular a 0d; + significativamente distinto en la misma línea celular entre 12 y 30d.

B) * significativamente distinto de 1.

C) Estudio de la expresión de las proteínas que forman parte de los receptores GABA-B-R1, GluR2-3, y NMDA2A (mediante inmunocitoquímica y *western blot*). En las imágenes observamos en rojo la expresión de estos receptores y en verde las neuronas β -III-Tubulina⁺ generadas en cultivos de células hVM1 y hVM1 high Bcl-X_L diferenciadas durante 30d. Los núcleos se muestran en azul, aunque fueron teñidos utilizando ToPro3 (rojo lejano). Barra de escala = 20 μ m. Para los *western blot*, la proteína calnexina se utilizó como control de carga.

En conclusión, a partir de las líneas hVM1 y hVM1 high Bcl-X_L podemos generar *in vitro* cultivos celulares con un 20% de neuronas tras 30d de diferenciación. La mayor parte de dichas neuronas son de tipo dopaminérgico ($8,06 \pm 0,43\%$ y $16,15 \pm 0,70\%$ respectivamente), encontrándose también neuronas gabaérgicas, glutamatérgicas y serotoninérgicas. Asimismo, las células diferenciadas presentes en los cultivos de ambas líneas celulares poseen receptores para los neurotransmisores GABA, glutamato y acetilcolina, además de para dopamina el cual fue demostrado en un apartado anterior.

III. **Análisis morfométrico de los cultivos de hVM1 y hVM1 high Bcl-X_L diferenciados durante largo tiempo *in vitro*.**

Un estudio detallado *in vitro* de la diferenciación neuronal ha de incluir el seguimiento y análisis de las neuritas y el tamaño del cuerpo celular. Mediante la aplicación NeuronJ del programa ImageJ es posible realizar un seguimiento semi-automático de las neuritas de manera individual para cada neurona seleccionada. Utilizando esta herramienta informática podemos calcular el área del cuerpo celular, el número medio de neuritas por célula TH positiva y la longitud media de las neuritas analizadas tanto en cultivos primarios de ratón derivados de mesencéfalo ventral (utilizados como control de neuronas dopaminérgicas genuinas) como en las neuronas generadas a partir de cultivos de las líneas hVM1 y hVM1 high Bcl-X_L.

Las neuronas dopaminérgicas generadas en los cultivos de células hVM1 y hVM1 high Bcl-X_L presentan una morfología similar a la descrita para las neuronas dopaminérgicas genuinas de la Substancia Nigra pars compacta. Su cuerpo celular es de tamaño mediano y de forma ovoide, poligonal o fusiforme. Son bipolares o multipolares, con un patrón de arborización de diversa complejidad. En este estudio se optó por el análisis general de las neuritas debido a que los marcadores tradicionalmente utilizados para identificar el axón (Tau5 y Smi31) no funcionaron en estos cultivos y por tanto no fue posible diferenciar las dendritas de axón.

En el caso de la medida del área del cuerpo celular, se analizaron las células TH positivas tanto de cultivos primarios de mesencéfalo ventral de ratón (22 días en cultivo), como de las células hVM1 y hVM1 high Bcl-X_L diferenciadas durante 30d. Como se muestra en la figura 10, no se encontraron diferencias significativas en el área del cuerpo celular entre los cultivos de células humanas y las neuronas TH positivas típicas de la región del mesencéfalo ventral estudiadas a partir de los cultivos primarios de ratón utilizados como controles. Tampoco se observaron diferencias significativas en la medida del área del cuerpo celular entre las líneas celulares hVM1 y hVM1 high Bcl-X_L.

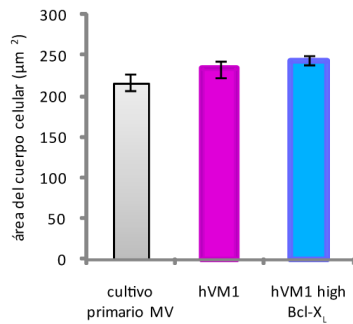


Fig. 10. Medida del área del cuerpo celular de las células TH⁺ obtenidas en cultivos primarios de ratón (E12) de mesencéfalo ventral (MV, 22d en cultivo) y de células hVM1 y hVM1 high Bcl-X_L diferenciadas durante 30d. El área del cuerpo celular fue calculada mediante el programa ImageJ, y se expresa como la media \pm ESM en μm^2 de >10 células TH⁺ analizadas por cubre y con n=3. No se aprecian diferencias significativas entre ninguno de los tres tipos celulares estudiados (según ANOVA, Tukey's test).

Posteriormente se estudiaron diversos parámetros morfométricos en las células TH positivas generadas en cultivo tras 12, 20 ó 30 días de diferenciación en comparación con cultivos primarios de mesencéfalo ventral de ratón. Como se aprecia en la figura 11a, el patrón de arborización a los 30d de diferenciación es muy similar para los tres tipos de cultivos analizados.

Si nos fijamos en el patrón temporal de cada tipo de neurita y tipo celular con la diferenciación (figura 11b), observamos que no existen diferencias significativas en el número medio de neuritas en las células TH positivas entre los cultivos primarios de ratón y hVM1 o hVM1 high Bcl-X_L durante 12 y 20d de diferenciación, pero a los 30d llama la atención la disminución en el número medio de neuritas primarias y secundarias en las hVM1 high Bcl-X_L respecto del resto del cultivos analizado. Lo que sí que varía es su longitud media a lo largo del tiempo (figura 11c). En los cultivos primarios podemos observar cómo la longitud media de cada tipo de neurita tiende a aumentar de 12 a 20d de diferenciación, disminuyendo posteriormente a los 30d. Sin embargo, los patrones en las hVM1 y las hVM1 high Bcl-X_L son muy diferentes. En la línea hVM1 la longitud de las neuritas disminuye a los 20d de diferenciación para aumentar a los 30d. En los cultivos de hVM1 high Bcl-X_L partimos de una longitud de neuritas que aumenta con los días de diferenciación (primarias, terciarias y cuaternarias) o que se mantiene desde al día 12 al 30 (secundarias).

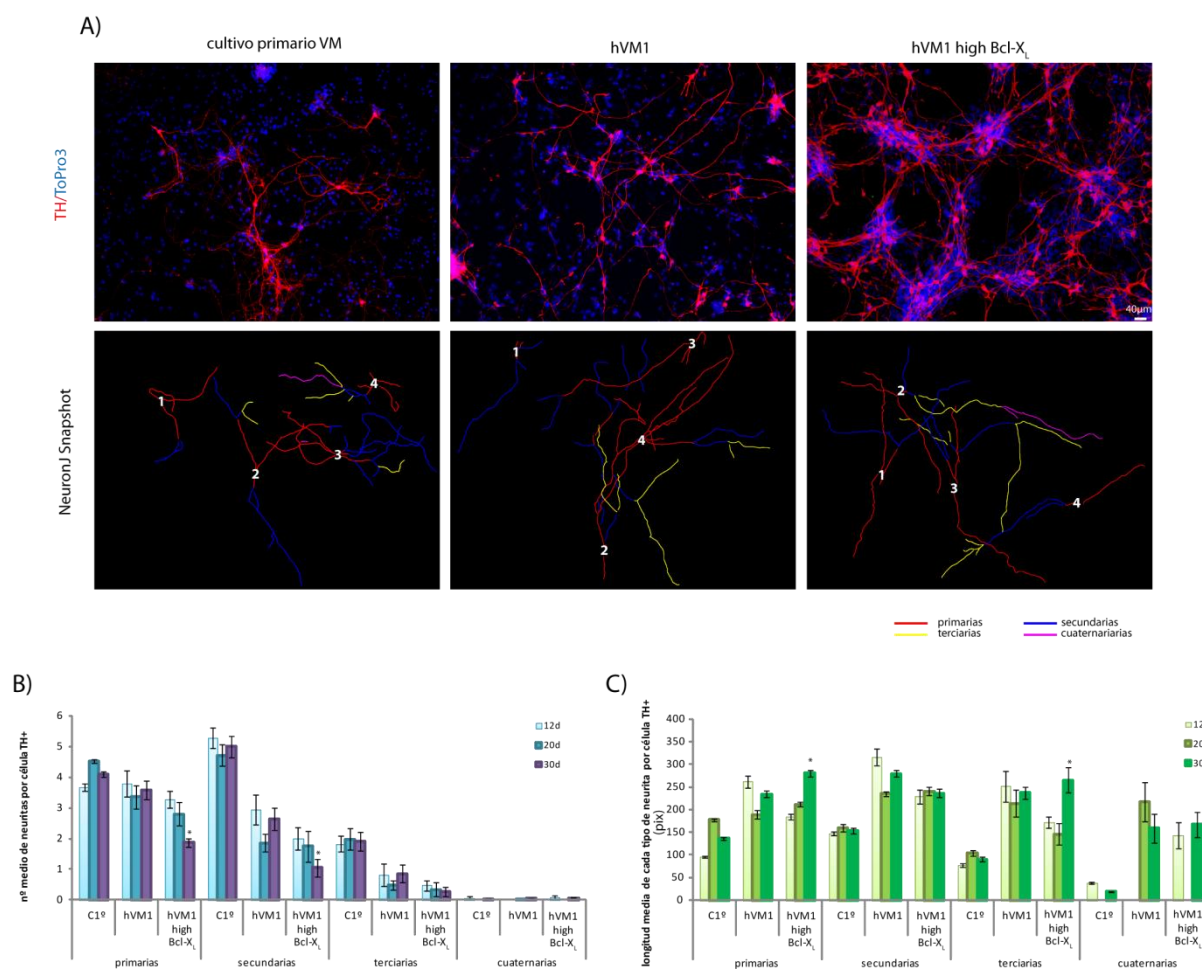


Fig. 11. Patrón de arborización de las células TH⁺ obtenidas a partir de cultivos primarios de ratón (E12) de mesencéfalo ventral (22d en cultivo, C1^o) y de células hVM1 y hVM1 high Bcl-X_L diferenciadas durante 30d.

A) Panel en el que podemos observar un ejemplo de cómo se realiza la medida de cada tipo de neurita en los tres tipos de cultivos celulares. En la parte superior podemos ver las imágenes de inmunofluorescencia contra TH (rojo) utilizadas para el análisis morfológico de las neuronas dopaminérgicas, y en la parte inferior una instantánea o *snapshot* obtenida tras el procesamiento de la imagen con la aplicación NeuronJ del programa ImageJ, mostrando esquemáticamente las neuritas primarias, secundarias, terciarias y cuaternarias de las cuatro células TH⁺ analizadas en el campo que se muestra en cada una de las imágenes superiores.

B) Visión general del número medio de neuritas primarias, secundarias, terciarias y cuaternarias presentes en las células TH⁺ de cada uno de los tres tipos de cultivos estudiados (C1^o de ratón, hVM1 y hVM1 high Bcl-X_L) en función del día de diferenciación (12, 20 y 30d). Estos estudios se realizaron analizando al menos 50 células TH⁺ en cada tipo celular y día de diferenciación. El número medio de cada tipo de neurita se expresa como la media ± ESM (*p<0,05, Kruskal-Wallis test, * significativamente diferente de 12d en cada tipo celular).

C) Representación global de la longitud media de cada tipo de neurita estudiada en las células TH⁺ de cada uno de los tres tipos de cultivos estudiados (C1^o de ratón, hVM1 y hVM1 high Bcl-X_L) en función del día de diferenciación (12, 20 y 30d). Estos estudios se realizaron analizando al menos 50 células TH⁺ en cada tipo celular y día de diferenciación. La longitud media de cada tipo de neurita se expresa como la media ± ESM (*p<0,05, Kruskal-Wallis test, * significativamente diferente de 12d en cada tipo celular).

Otra forma más visual y sencilla de examinar estos resultados consiste en comparar a cada día de diferenciación por separado los cuatro tipos de neuritas en los dos cultivos celulares en paralelo (figura 12a). De esta forma se observa que a 12d no existen diferencias en el número de neuritas primarias entre los cultivos de células hVM1 o hVM1 high Bcl-X_L

respecto de cultivos primarios de mesencéfalo ventral (control). A partir de los 20d de diferenciación hay una tendencia a la disminución en el número medio de neuritas primarias por célula TH positiva en las hVM1 respecto de los cultivos control, que es estadísticamente significativa en el caso de las hVM1 high Bcl-X_L. En el caso de las neuritas secundarias y terciarias podemos observar tanto a 12, 20 ó 30d de diferenciación cómo su presencia es menor en las células hVM1 y hVM1 high Bcl-X_L que en los cultivos primarios control. Entre las líneas hVM1 no existen diferencias significativas a excepción del número medio de neuritas secundarias a los 30d de diferenciación, cuyo número es significativamente menor en los cultivos hVM1 high Bcl-X_L. A nivel de número medio de neuritas cuaternarias no se encontraron diferencias significativas entre los tres tipos de cultivos.

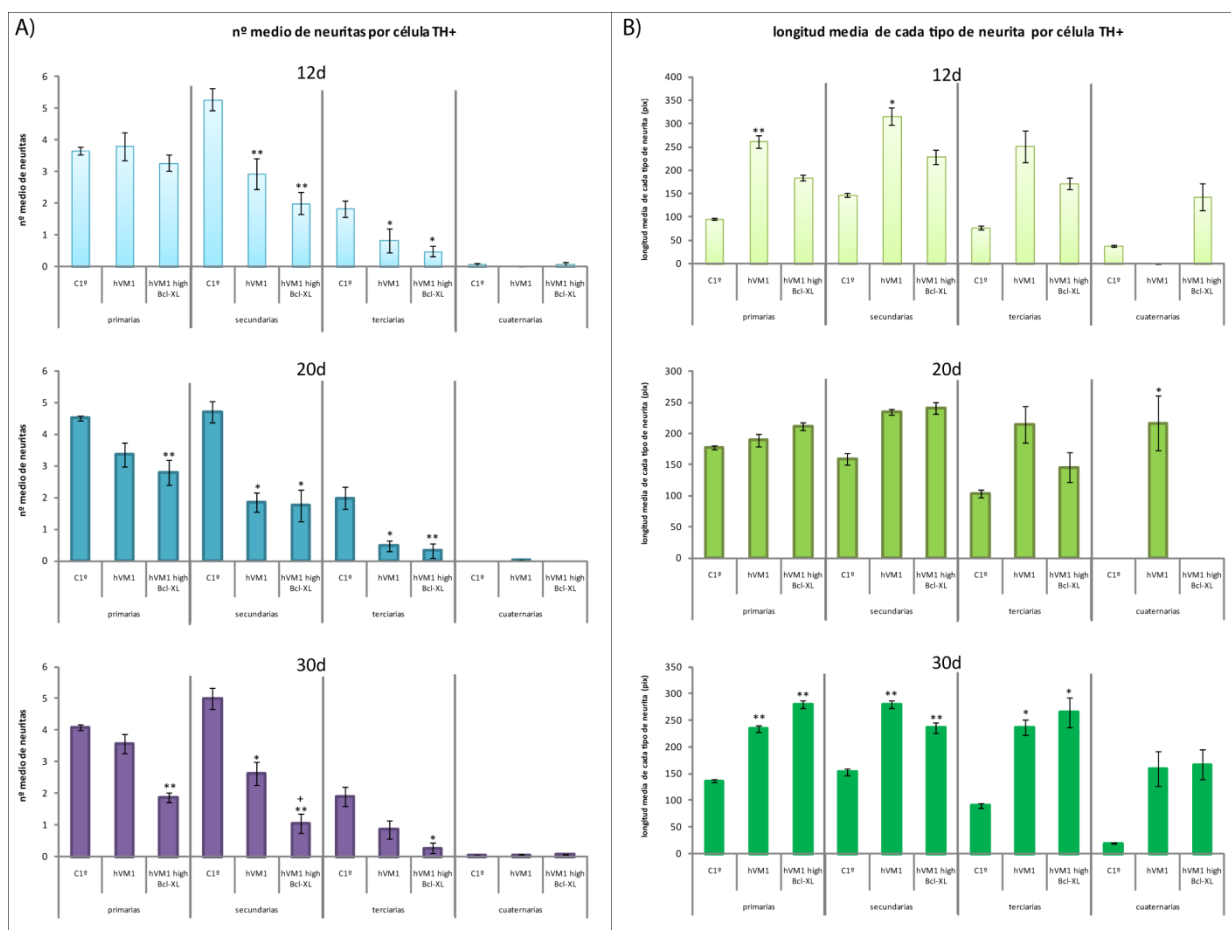


Fig. 12. Número y longitud media de cada tipo de neurita según el día de diferenciación.

A) Número medio de neuritas primarias, secundarias, terciarias y cuaternarias presentes en las células TH⁺ de cada uno de los tres tipos de cultivos estudiados (primarios de ratón (C19), hVM1 y hVM1 high Bcl-X_L) según se hayan diferenciado 12, 20 o 30d. Estos estudios se realizaron analizando al menos 50 células TH⁺ en cada tipo celular y día de diferenciación. El número medio de cada tipo de neurita se expresa como la media ± ESM (*p<0,05; **p<0,01; Kruskal-Wallis test, * significativamente diferente de su valor en C19 a ese día de diferenciación).

B) Longitud media de cada tipo de neurita estudiada en las células TH⁺ de cada uno de los tres tipos de cultivos estudiados (C19 de ratón, hVM1 y hVM1 high Bcl-X_L) según se hayan diferenciado 12, 20 o 30d. Estos estudios se realizaron analizando al menos 50 células TH⁺ en cada tipo celular y día de diferenciación. La longitud media de cada tipo de neurita se expresa como la media ± ESM (*p<0,05; **p<0,01; Kruskal-Wallis test, * significativamente diferente de su valor en C19 a ese día de diferenciación).

En resumen, el número medio de neuritas primarias (20 y 30d) y secundarias-terciarias (12, 20 y 30d) de las células TH positivas generadas a partir de cultivos hVM1 o hVM1 high Bcl-X_L es ligeramente menor que en las generadas a partir de cultivos primarios de mesencéfalo ventral de ratón. Entre ambas líneas celulares humanas no existen diferencias significativas.

Cuando nos centramos en estudiar la longitud media de cada tipo de neurita en las células TH positivas (figura 12b) observamos una tendencia a que dicha longitud sea mayor en las células hVM1 y hVM1 high Bcl-X_L respecto de los cultivos primarios control tanto a 12 como a 20 y 30d. Dicha tendencia es significativa en el caso de las neuritas primarias y secundarias a 12d y cuaternarias a 20d para los cultivos hVM1, además de para las neuritas primarias, secundarias y terciarias en hVM1 y hVM1 high Bcl-X_L a 30d de diferenciación. También cabe destacar que no existen diferencias significativas en la longitud media de cada tipo de neurita para ambas líneas celulares humanas.

Por último, y con objeto de entender globalmente el grado de arborización estudiamos la longitud total media de las neuritas de cada célula TH positiva examinada (figura 13), viendo cómo existen longitudes de arborización diferentes para cada tipo celular y tiempo de diferenciación. En los cultivos primarios de mesencéfalo ventral la longitud total de las neuritas aumenta significativamente a partir de los 12d, sin que existan diferencias tras 20-30d de diferenciación. Al estudiar las células hVM1 observamos una disminución en la longitud total de las neuritas entre los 12 y los 20d de diferenciación. Tras 30d, dicha longitud tiende a aumentar, igualándose a la de los cultivos primarios de mesencéfalo ventral. Los cultivos de células hVM1 high Bcl-X_L presentan una tendencia a la disminución en la longitud total de las neuritas de las células TH positivas estudiadas. Su medida es significativamente menor a 12 y 30d respecto de las células hVM1 y a los 20 y 30d respecto de los cultivos primarios de mesencéfalo ventral.

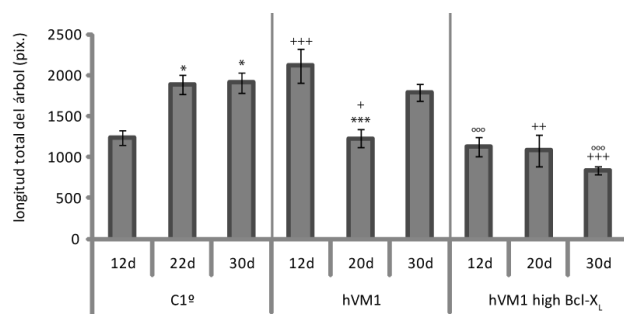


Fig. 13. Longitud total del árbol de neuritas de una célula TH⁺.

Medida de la longitud total media de los cuatro tipos de neuritas encontrados en las células TH⁺ de los tres tipos celulares estudiados tanto a 12, como 20 y 30d de diferenciación. La longitud total del árbol se expresa como la media de la suma de cada tipo de neurita \pm ESM (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; ANOVA Tukey's test).

* Estadísticamente diferente de 12d en el mismo tipo celular.

+ Estadísticamente significativo respecto del mismo día de diferenciación en C1^o.

^o Estadísticamente significativo entre hVM1 y hVM1 high Bcl-X_L a ese día de diferenciación.

Tras 30d de diferenciación no se observan diferencias significativas en la longitud total de las neuritas de las células TH positivas entre los cultivos primarios de mesencéfalo ventral y las células hVM1, pero si es significativamente menor su valor en los cultivos de células hVM1 high Bcl-X_L.

Estos datos nos revelarían un patrón de distribución de neuritas en las células hVM1 y hVM1 high Bcl-X_L similar al de las células TH positivas derivadas de cultivos primarios de mesencéfalo ventral, pero con una arborización menos compleja, que se manifiesta a nivel de las neuritas secundarias y terciarias durante toda la diferenciación y primarias sólo a tiempos de diferenciación avanzados, y con una longitud total de arborización menor a 30d en el caso de hVM1 high Bcl-X_L. Además, este estudio revela un patrón de extensión/pérdida de prolongaciones particular para cada tipo celular según progresa la diferenciación.

IV. Estudios del transportador de dopamina DAT.

El transportador de dopamina DAT es esencial en las neuronas dopaminérgicas maduras y funcionales. Interviene en la re-captura de la dopamina que tiene lugar en los terminales presinápticos modulando la efectividad sináptica, los niveles extracelulares del

neurotransmisor y regulando la disponibilidad de dopamina para la activación de los receptores pre y postsinápticos (Giros and Caron, 1993).

a) Estudios *in vivo* con 4-Di-2-ASP.

El ASP+ (4-(-(dietilamino) estirilo)-N-metilpirimidina yoduro) es un análogo fluorescente de la 1-metil-4-fenilpirimidina, neurotoxina bien estudiada que es transportada por los transportadores de monoaminas. El ASP+ fue primero utilizado como sustrato de los transportadores de cationes orgánicos, por medio de los cuales entraba en las células y llegaba hasta la mitocondria. Sin embargo, posteriormente se descubrió que el ASP+ podía ser utilizado como sustrato de los transportadores de aminas biogénicas (DAT, transportador de dopamina; NET, transportador de norepinefrina; o SERT, transportador de serotonina) ya que emite una fuerte señal fluorescente roja únicamente cuando está unido a la proteína que constituye el transportador o cuando está finalmente unido a la mitocondria (Blakely and DeFelice, 2007; Blakely et al., 2005; Jorgensen et al., 2008)(ver esquema en figura 14a). En cultivos celulares vivos, las células que expresen DAT pueden de esta forma ser visualizadas en tiempo real utilizando ASP+ y microscopía confocal.

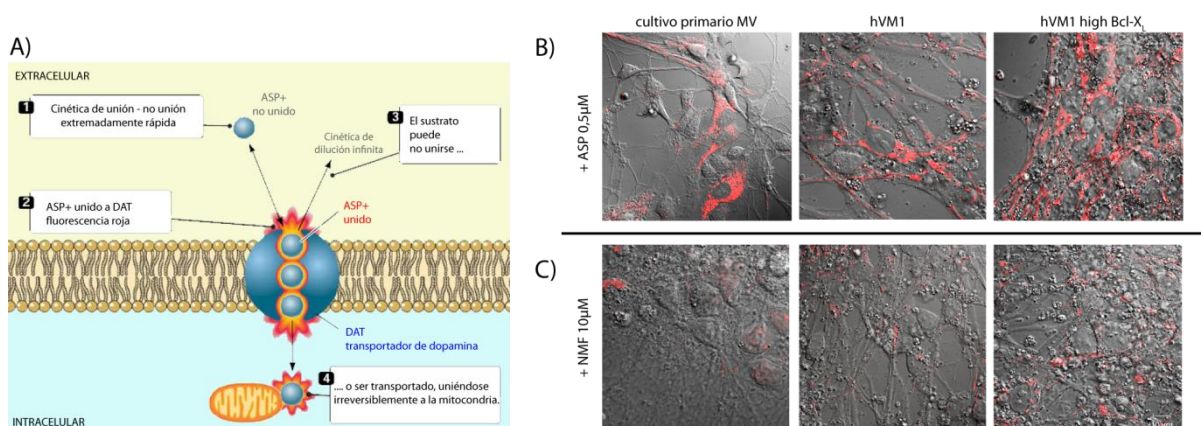


Fig. 14. Estudios *in vivo* del transportador de dopamina DAT mediante el sustrato ASP+.

A) Esquema que ilustra la dinámica de unión del ASP+ a DAT, emitiendo entonces una intensa fluorescencia roja. Una vez unido, el ASP puede transportarse al interior de las células hasta quedar unido irreversiblemente a la mitocondria. Modificado de Blakely et al., 2005.

B) Imágenes de microscopía confocal y contraste de fases de cultivos primarios de mesencéfalo ventral (MV) (1 semana) y de células hVM1 y hVM1 high Bcl-X_L diferenciadas durante 30d. En rojo se pueden ver aquellas células que poseen un DAT funcional. En estas células el ASP emite una fluorescencia roja ya que está unido a DAT o ha sido internalizado a través del mismo y se encuentra unido a la mitocondria. C) Cuando los cultivos son tratados previamente a la incubación con ASP+ con nomifensina, DAT se bloquea y no se aprecia señal de fluorescencia roja ya que el ASP+ no puede unirse a él ni penetrar en el interior de las células.

Se llevaron a cabo estudios para visualizar la funcionalidad del transportador de dopamina en cultivos vivos de células hVM1 y hVM1 high Bcl-X_L diferenciadas 30d y cultivos primarios de mesencéfalo ventral de ratón mantenidos durante una semana y utilizados como control del comportamiento esperable de una neurona primaria y de la validez de la sonda. Para comprobar la actividad específica del transportador, parte de los cultivos estudiados fueron tratados con nomifensina, un agente inhibidor de la recaptura de dopamina a través de DAT.

Una vez tratados los cultivos con ASP+ en ausencia de nomifensina, vemos (figura 14b) como sólo algunas células de los cultivos lo están transportando o lo han incorporado en su interior, lo que descarta una acumulación inespecífica. En solución, su fluorescencia roja tiene poca intensidad y puede descartarse fácilmente utilizando microscopía confocal. Las células fluorescentes rojas de la figura corresponderán a aquellas neuronas dopaminérgicas equipadas con un transportador de dopamina funcional. Podemos interpretar que las células ASP+ son dopaminérgicas, ya que el porcentaje de neuronas serotoninérgicas y noradrenérgicas que se genera en estos cultivos es nulo o inferior al 0,1% y, por tanto, es muy improbable que la sonda haya sido incorporada a las células a través de NET o SERT. En la imagen podemos ver como las células ASP+ positivas presentan marcada en rojo tanto la membrana plasmática como el interior celular, lo que indica que el ASP+ es incorporado a través de DAT (proteína integral de membrana de los terminales dopaminérgicos presinápticos) al interior celular hasta llegar finalmente a la mitocondria. No se observan diferencias cualitativas en la incorporación de ASP+ a través de DAT entre cultivos primarios de mesencéfalo ventral, células derivadas de hVM1 o los cultivos de células hVM1 high Bcl-X_L. Además, se comprobó la especificidad de la entrada de ASP+ a través de DAT pre-incubando parte de los cultivos con el agente inhibidor de DAT nomifensina. Como se observa en la figura 14c, los cultivos previamente tratados con este inhibidor no presentan células marcadas, por lo que no han incorporado el ASP+ en su interior, lo que demuestra la efectividad de la sonda para medir la funcionalidad de DAT en experimentos *in vivo*.

Podemos concluir que los cultivos de células hVM1 y hVM1 high Bcl-X_L diferenciados 30d poseen un DAT funcional, siendo su actividad de transporte cualitativamente similar a la observada en cultivos primarios de mesencéfalo ventral de ratón.

b) Tratamiento de los cultivos con 6-OHDA.

Otra forma indirecta, a nivel de efectos en la biología de las células, de demostrar la presencia de un DAT funcional está relacionada con la citotoxicidad de la 6-hidroxidopamina (6-OHDA) ampliamente estudiado en las neuronas dopaminérgicas (Sauer and Oertel, 1994; Sauer et al., 1995). La 6-OHDA, como análogo de la dopamina, es transportada al interior de estas células mediante de DAT, acumulándose en ellas y produciendo una muerte celular relacionada con la mitocondria. Una reducción en el número de neuronas dopaminérgicas del cultivo por tanto sería una evidencia indirecta de la presencia de DAT y que se encuentra activo. Para evitar el problema hipotético de si la muerte celular fuese debida a la generación de radicales libres en el cultivo por la auto-oxidación de la droga aplicada, no relacionado con la actividad de DAT, se incluyeron en el experimento células tratadas con el inhibidor nomifensina. Al bloquear DAT se debería bloquear la muerte celular por citotoxicidad en las neuronas dopaminérgicas, determinando así si existe muerte inespecífica en los cultivos debida al tratamiento con 6-OHDA por auto-oxidación o no. La existencia de un menor porcentaje de neuronas dopaminérgicas rescatable por nomifensina sería la demostración fehaciente de un transportador DAT funcional.

Se estudió por tanto la sensibilidad de los cultivos de células hVM1 y hVM1 high Bcl-X_L diferenciados 30d al tratamiento con 6-OHDA con y sin nomifensina, aplicados durante 1, 2 ó 3 días. En paralelo se llevaron cultivos de ambas líneas celulares que sirvieron como control de la diferenciación sin tratamiento. Posteriormente se cuantificó el número de células TH positivas obtenidas en cada condición y tipo celular. Como se ve en la figura 15 a y b el comportamiento de las dos líneas celulares frente al tratamiento con 6-OHDA o 6-OHDA+nomifensina claramente demuestra la presencia de un transportador funcional, con algunas diferencias. En las células hVM1 (figura 15a) no se observan diferencias en el porcentaje de células TH positivas tras 1 día de tratamiento con 6-OHDA, manteniéndose en torno al 11% del total de células del cultivo. Cuando el tratamiento se administra durante 2 días el porcentaje de células TH positivas desciende un 63% respecto del número visto en cultivos sin tratar. Si aplicamos 6-OHDA+nomifensina no se observa esa disminución, manteniéndose los valores de células TH positivas al mismo porcentaje que en cultivos sin tratar (11%). Cuando la 6-OHDA se aplica durante 3 días, la disminución en el porcentaje de células TH positivas es similar a la anterior (del 63%). Esta disminución en el número de células TH positivas no puede impedirse con la aplicación de nomifensina, resultando tras estos días de tratamiento excesiva la toxicidad acumulada por la presencia de 6-OHDA.

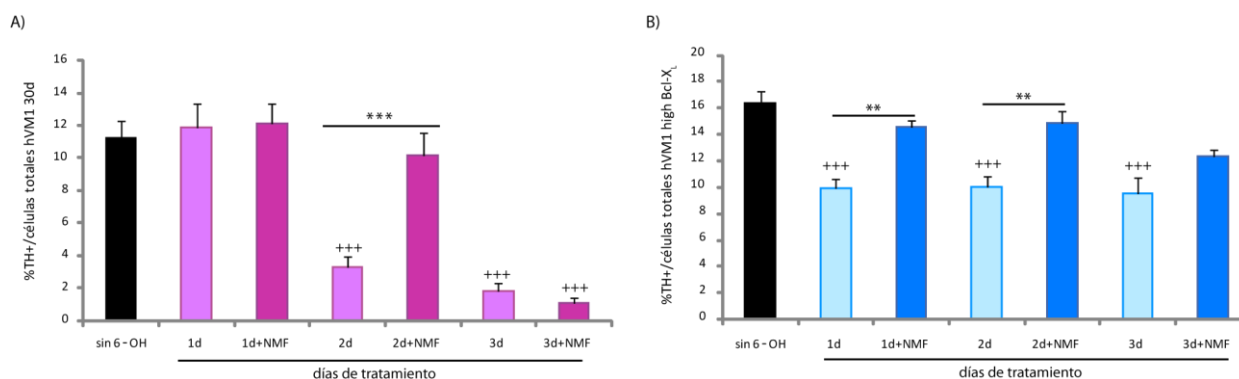


Fig. 15. Estudios indirectos *in vitro* de la actividad de DAT en cultivos de células hVM1(A) y hVM1 high Bcl-X_L (B) diferenciadas durante 30d.

El tratamiento de los cultivos diferenciados de células hVM1 y hVM1 high Bcl-X_L con 6-OHDA durante 1, 2 o 3d provoca un descenso en el número de células TH⁺. Esto indica de manera indirecta la presencia en los cultivos de DAT funcional, ya que la 6-OHDA es un análogo de la dopamina que entra en las neuronas dopaminérgicas a través de DAT produciendo su muerte por citotoxicidad. Si dicha muerte se debe a la entrada de la 6-OHDA a través de DAT, cuando se administra a los cultivos nomifensina (NMF), queda bloqueada la actividad del transportador y en número de células TH⁺ de los cultivos no se ve afectado. Se observan diferencias en la respuesta de los dos tipos de cultivos ante el tratamiento con 6-OHDA y la aplicación de nomifensina. La reducción en el %TH⁺ es mayor en los cultivos hVM1 a 2d tras el tratamiento con 6-OHDA. El bloqueo con NMF en esta línea celular sólo parece efectivo a los 2d. En las células hVM1 high Bcl-X_L la disminución en el %TH⁺ es menos drástica que en hVM1, pero similar durante los 3d de tratamiento y siempre rescatable por NMF. Los datos se expresan como el porcentaje medio \pm ESM n=3 (*p<0.05 **p<0.01; ***p<0.001; ANOVA, Tukey's test).

+ Significativamente distinto del porcentaje sin 6-OHDA.

* Significativamente distinto del porcentaje obtenido entre 6-OHDA y 6-OHDA+NMF.

En el caso de los cultivos de células hVM1 high Bcl-X_L (figura 15b) observamos que la administración de 6-OHDA desde el día 1 de tratamiento hasta el día 3 provoca una reducción idéntica del 33% de las células TH positivas respecto a lo descrito para cultivos sin tratar a 30d de diferenciación. La aplicación de 6-OHDA+nomifensina es capaz de impedir dicha disminución tras 1 ó 2 días de tratamiento.

Podemos concluir por tanto que DAT está activo en ambas líneas celulares aunque el resultado de este estudio de transporte de 6-OHDA sea diferente en cada una de ellas. En las células hVM1 el efecto citotóxico de la 6-OHDA sólo es observable sobre las neuronas dopaminérgicas tras 2 días con el tratamiento. Cuando su administración se prolonga (3 días) posiblemente se combinan los efectos citotóxicos y de generación de radicales libres por la 6-OHDA, no pudiendo ser revertida la disminución en el número de neuronas dopaminérgicas al bloquear DAT con el inhibidor nomifensina. Las células hVM1 high Bcl-X_L en cambio presentan un efecto en la reducción del número de células TH positivas desde el día 1 de la aplicación de la 6-OHDA lo cual podría estar indicando una mayor presencia/actividad de DAT en este tipo celular. Dicha reducción es un 50% menor que en el caso de los cultivos de hVM1, por lo que Bcl-X_L es probable que esté ejerciendo algún efecto de protección específico en este tipo de neuronas. El efecto citotóxico puede ser siempre revertido al bloquear DAT con nomifensina y

la sobre-expresión de Bcl-X_L estaría bloqueando la muerte celular asociada a la generación de radicales libres de la 6-OHDA debido a su conocida función anti-apoptótica.

c) Re-captura de dopamina.

Adicionalmente a las demostraciones indirectas de la presencia de un transportador DAT funcional, descritas anteriormente, decidimos comprobar su funcionalidad directamente midiendo la captura de dopamina a través del transportador utilizando [³H]-dopamina (Horn, 1990; Ko et al., 2007) y calculando la cantidad de radiactividad incorporada en las células. La ventaja de utilizar sustratos marcados radiactivamente es que, a diferencia de los ensayos con ligandos fluorescentes para transportadores de monoaminas, estamos analizando la actividad de DAT específicamente. Además, estos estudios tienen una mayor sensibilidad y el número de moléculas transportadas puede ser determinado con mayor precisión.

Así, se llevaron a cabo estudios de incorporación de dopamina en células hVM1 y hVM1 high Bcl-X_L diferenciadas 30d y en cultivos primarios de mesencéfalo ventral utilizados como control del comportamiento de las neuronas dopaminérgicas típicas. Una vez restada la incorporación no específica de la radiactividad (determinada en presencia del inhibidor nomifensina), se puede concluir que los valores de captura de dopamina obtenidos en hVM1 y hVM1 high Bcl-X_L no presentan diferencias significativas respecto de los cultivos primarios (figura 16). Tampoco observamos diferencias entre las líneas de células humanas analizadas.

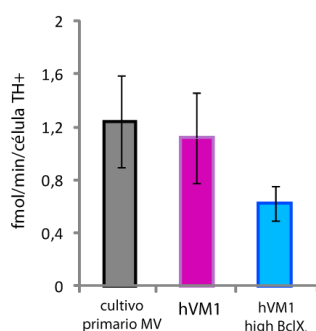


Fig. 16. Estudio de la actividad de DAT mediante la medida de la re-captura de dopamina en cultivos primarios de ratón y de células hVM1 y hVM1 high Bcl-X_L diferenciadas durante 30d.

La re-captura de dopamina se calcula restando los valores no específicos (DAT bloqueado con nomifensina) del valor total obtenido en el ensayo. El valor de re-captura de dopamina por célula TH⁺ se calculó dividiendo cada dato de ³H-DA entre el número de células TH⁺ generadas en cada tipo de cultivo. No se observan diferencias significativas entre los cultivos estudiados según ANOVA, Tukey's test. Los datos se expresan como la media ± ESM n=6.

De estos resultados concluimos que las tanto las células hVM1 como hVM1 high Bcl-X_L poseen un DAT funcional cuya tasa de incorporación de dopamina es similar a la detectada en cultivos primarios de mesencéfalo ventral de ratón.

V. Imagen de la endocitosis y exocitosis de vesículas sinápticas.

Continuando con el trabajo anterior en el sentido de obtener evidencias de la funcionalidad de las neuronas generadas en los cultivos de hVM1 y hVM1 high Bcl-X_L diferenciados, decidimos estudiar la dinámica de vesículas sinápticas en cultivos vivos. En estudios anteriores realizados en el laboratorio, se demostró la expresión de proteínas presinápticas como sinapsina y sinaptofisina (Courtois et al., 2010).

El FM4-64 es un miembro de la familia de sondas de estirilo de amplio uso para el marcaje de sinapsis activas. Estas sondas exhiben una intensa fluorescencia únicamente tras la inserción de sus colas hidrofílicas en bicapas lipídicas. Cuando la superficie de una célula es expuesta a una sonda del tipo FM se marca la totalidad de la membrana (ver figura 17a) y parte de la sonda se queda atrapada en vesículas (sinápticas) generadas por endocitosis.

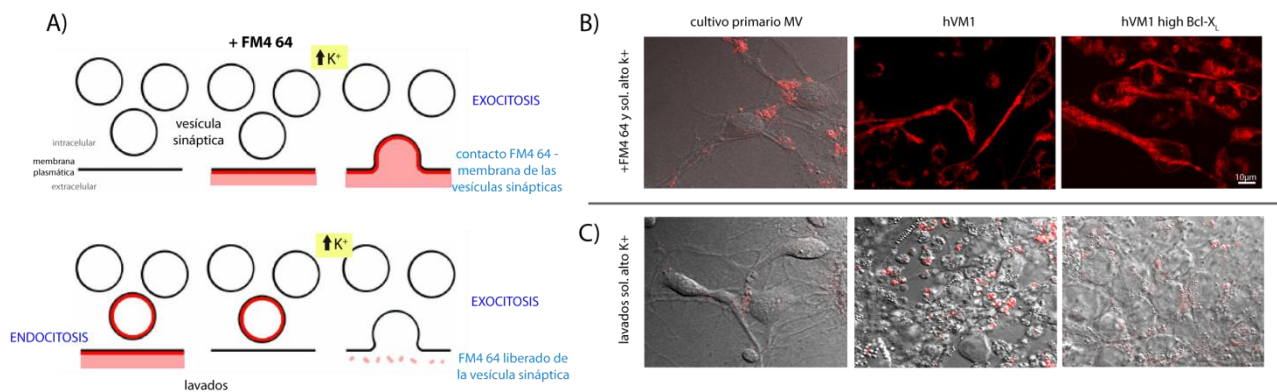


Fig. 17. Imagen de endocitosis y exocitosis de vesículas sinápticas mediante FM4 64.

A) Esquema representativo de la dinámica de marcaje de la sonda FM4 64. El FM4 64 tiene una fluorescencia débil en disolución. Tras estimular la exocitosis al aplicar una solución con alto K⁺ en los cultivos, las vesículas sinápticas se unen a la membrana plasmática y quedan expuestas al FM4 64. Este, una vez unido a la membrana, exhibe una intensa fluorescencia roja. Las neuronas activas incorporan las vesículas marcadas mediante endocitosis. El FM4 64 del exterior puede lavarse fácilmente, detectando las neuronas activas del cultivo por la fluorescencia roja que se ve en su interior. Posteriormente, los cultivos pueden recibir otro estímulo de alto K⁺, provocando de nuevo la exocitosis de las vesículas sinápticas y en este caso la liberación del FM4 64 al medio extracelular. Modificado de Gaffield and Betz, 2006.

B y C) Imágenes de microscopía confocal de cultivos primarios de ratón (20d) y de células hVM1 y hVM1 high Bcl-X_L diferenciadas durante 30d, incubados con FM4 64 que muestran una intensa fluorescencia roja tras la incorporación de la sonda en las vesículas sinápticas B) o una ausencia de ella tras su lavado y estimulación con alto K⁺ para provocar su exocitosis.

Posteriormente, al lavar con una solución libre de sonda, sólo la parte de la membrana que no se expone al lavado es capaz de retener la fluorescencia. Por ello, la incorporación del FM4-64 en las regiones de la membrana plasmática que forman una vesícula sináptica resultan marcadas tras los lavados y permitiendo su posterior detección en el interior celular. Este tipo de sondas resultan ser una herramienta muy útil para el marcaje de las sinapsis

funcionales en los cultivos de neuronas (Gaffield and Betz, 2006; Wegner et al., 2008). Una vez marcado el conjunto de vesículas sinápticas, si la neurona es eléctricamente activa, se puede inducir la fusión de las vesículas por despolarización. Como consecuencia, la sonda es de nuevo expuesta al exterior, eliminándose por lavado de la membrana. De esta forma, se puede marcar y estudiar la generación de vesículas sinápticas y su liberación tras despolarización, constituyendo una evidencia directa de funcionalidad neuronal. Una limitación que presenta la técnica es que, aunque existen análogos fijables de la sonda, debido a los lavados exhaustivos y el tiempo de recogida de imágenes, las células que incorporan la sonda no pueden ser estudiadas mediante inmunocitoquímica tras su fijación. Por tanto, aunque hubiese sido deseable co-localizar las vesículas con la tinción para TH, no es técnicamente posible.

De esta forma, cultivos de células hVM1 y hVM1 high Bcl-X_L diferenciados 30d y cultivos primarios de mesencéfalo ventral de ratón (20d) fueron incubados con la sonda FM4-64 (ver esquema figura 17a). Tras la aplicación en los cultivos de una solución despolarizante (alto K⁺, para estimular la exocitosis y favorecer la posterior endocitosis) y el posterior lavado con una solución salina para eliminar la fluorescencia no incorporada, observamos como aquellas regiones de membrana donde se produce la endocitosis de vesículas sinápticas presentan una marcada fluorescencia roja (figura 17b). Cuando aplicamos de nuevo a los cultivos la solución de alto K⁺ se produce una nueva despolarización de la membrana que provoca la exocitosis de las vesículas sinápticas. Tras la fusión de las vesículas a la membrana plasmática se produce la liberación de la sonda FM4-64 al espacio extracelular, disminuyendo por lavado la señal de fluorescencia hasta casi desaparecer (figura 17c).

Por tanto, mediante el marcaje de vesículas sinápticas con FM4-64 podemos ver como los cultivos de células hVM1 y hVM1 high Bcl-X_L en diferenciación pueden ser despolarizados “in vivo” con una solución de alto potasio, provocando así la endocitosis y exocitosis de vesículas sinápticas, de una manera similar en todos los aspectos a un cultivo neuronal primario.

VI. Estudios de imagen de calcio citosólico con Fura2.

Estos estudios fueron realizados en colaboración con la Dra. Milagros Ramos.

La apertura de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (VOCCs) producida por una despolarización de la membrana plasmática, provoca un aumento del calcio intracelular. El Ca^{2+} actúa como segundo mensajero y en función de la velocidad, amplitud y duración de la señal se activan diferentes vías de señalización dependientes de calcio. La despolarización de la membrana en cultivo se puede realizar en presencia de concentraciones elevadas de K^+ y de esta forma se determina si la célula responde a este estímulo con un aumento del calcio intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$). Este aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ demostraría directamente excitabilidad neuronal que implica existencia de un potencial de membrana, presencia de canales funcionales de Ca^{2+} dependientes de voltaje y la existencia de los mecanismos necesarios de recuperación en las células para volver a los niveles basales previos al estímulo.

Para determinar la presencia de células excitables en los cultivos de ambas líneas celulares, se realizaron medidas de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en respuesta a un aumento de concentración de K^+ en el medio extracelular, utilizando un sistema de imagen de calcio e incubando las células con la sonda Fura2, capaz de unir calcio intracelular.

a) Respuesta a despolarización por alto KCl.

En la Figura 18 se muestran los resultados obtenidos al perfundir los cultivos celulares de la línea hVM1 diferenciados 7d con una solución isosmótica conteniendo 60mM KCl. durante 2 minutos (figura 18a). Se produce un aumento transitorio de $[\text{Ca}^{2+}]_i$, siendo la célula capaz de volver a su situación basal a los pocos minutos (figura 18b). Esto demuestra la presencia de canales de calcio dependientes de voltaje en las células hVM1. Además, una misma célula es capaz de responder incluso a 3 estímulos consecutivos de alto KCl. volviendo a su situación basal tras el cese de los estímulos. El porcentaje de células con canales de calcio dependientes de voltaje resultó ser de un 4.7% respecto al total de las células a los 7 días de diferenciación (tabla 3).

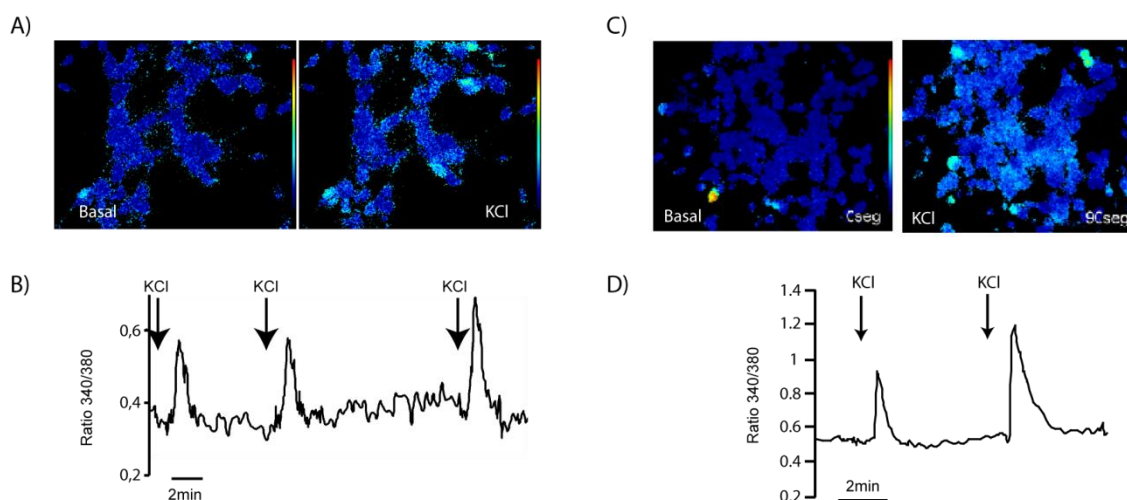


Fig. 18. Estudios de imagen de calcio con Fura2: despolarización por alto KCl.

A y C) Imágenes de ratio 340/380 de células hVM1 y hVM1 high Bcl-X_L respectivamente, diferenciadas durante 7 días y cargadas con la sonda Fura-2. En el panel de la izquierda se muestra la situación basal y en el panel de la derecha la imagen de ratio del mismo campo después de haberse administrado KCl 60mM durante un periodo de 90 segundos. Las variaciones de pseudocolor se deben al cambio en el ratio 340/380, lo que indica que la célula está respondiendo a la despolarización con un aumento en la concentración de calcio intracelular. La pseudocoloración de las imágenes de ratio corresponde a una graduación de colores que van desde el azul (nivel basal) hasta el rojo (mayores niveles de Cai).

B y D) Ejemplo de una respuesta a 60mM KCl, aplicado durante 2 minutos, registrada en las células hVM1 y hVM1 high Bcl-X_L respectivamente tras 7 días de diferenciación.

Al igual que en las células hVM1, en la línea celular hVM1 high Bcl-X_L la perfusión de un medio isosmótico conteniendo KCl 60mM durante 2 minutos (figura 18c) produce una despolarización, y por tanto un aumento transitorio de la concentración de calcio intracelular, en un $6.13 \pm 1.66\%$ a los 7 días de diferenciación. Como se observa en la figura 18d, las células sufren un aumento transitorio de la concentración de calcio intracelular, volviendo a los pocos minutos a su estado basal. Una misma célula es capaz de responder a varios estímulos despolarizantes consecutivos. A los 7d tenemos un $6,1 \pm 1,6\%$ de células que responden a KCl.

b) Respuesta a neurotransmisores relacionados con la funcionalidad de neuronas A9 de SNpc.

En este apartado se describe el trabajo realizado para conocer el comportamiento de las líneas celulares hVM1 y hVM1 high Bcl-X_L en presencia de los neurotransmisores de los receptores más característicos presentes en neuronas dopaminérgicas de mesencéfalo ventral, como son glutamato, dopamina y GABA (Bustos et al., 2004) y su capacidad para generar un aumento de calcio intracelular que actuará como segundo mensajero intracelular.

Como se observa en la figura 19a las células hVM1 diferenciadas 7d responden a la aplicación de glutamato con un aumento en la concentración de calcio intracelular, que es inhibido al añadir al medio el antagonista MK801, específico de receptores de glutamato de tipo NMDA, indicando la especificidad de la señal. El porcentaje de células con capacidad para responder a glutamato 100 μ M se contabilizó en un $9.6 \pm 2.7\%$.

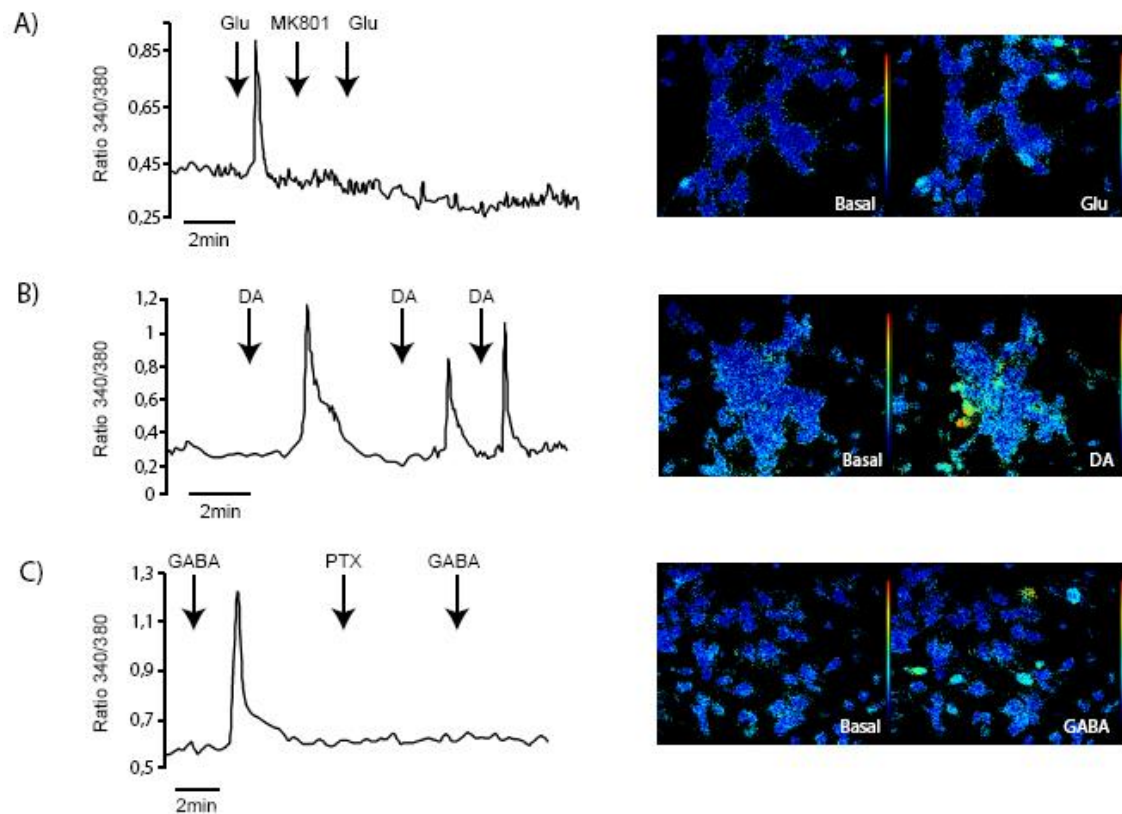


Fig. 19. Estudios de imagen de calcio con Fura2: respuesta a neurotransmisores.

A) Ejemplo de una célula hVM1 diferenciada durante 7 días mostrando respuesta a la aplicación durante 2 minutos de glutamato (Glu) 100 μ M y la inhibición de la respuesta por 50 μ M MK-801. En los paneles de la derecha se muestran las imágenes de ratio en condiciones basal y tras la aplicación del neurotransmisor.

B) Ejemplo de una célula hVM1 diferenciada durante 7 días mostrando respuesta a la aplicación durante 2 minutos de dopamina (DA) 100 μ M. En los paneles de la derecha se muestran las imágenes de ratio en condiciones basal y tras la aplicación del neurotransmisor.

C) Ejemplo de una célula hVM1 diferenciada durante 7 días mostrando respuesta a la aplicación durante 2 minutos de GABA 100 μ M y la inhibición de la respuesta producida por 100 μ M picrotoxina (PTX). En los paneles de la derecha se muestran las imágenes de ratio en condiciones basal y tras la aplicación del neurotransmisor GABA.

La adición de dopamina 100 μ M al cultivo de células hVM1, provocó un aumento transitorio en la concentración de calcio citosólico en un $8.8 \pm 1.9\%$ de las células hVM1 (figura 19b). La dopamina puede despolarizar o hiperpolarizar neuronas a través de receptores de tipo D1 o D2, respectivamente (Lacey et al., 1989).

La adición del neurotransmisor GABA 100 μ M a las células hVM1 diferenciadas durante 7 días produce, en un $7.3 \pm 1.7\%$ de las células, un aumento en la concentración de $[Ca^{2+}]_i$ (figura

19c). Este aumento transitorio en la concentración de calcio intracelular es inhibido por picrotoxina a una concentración 100 μ M, la picrotoxina es antagonista de los receptores de GABA de tipo A. Este hecho nos induce a pensar que las neuronas presentes en el cultivo de células hVM1 diferenciadas durante 7 días, presentan un grado de inmadurez alto, ya que como se ha descrito previamente el neurotransmisor GABA se comporta como un neurotransmisor excitatorio durante la maduración neuronal (Rivera et al., 1999) y en el cerebro en desarrollo (Cherubini et al., 1991).

En el caso de los cultivos de células hVM1 high Bcl-X_L a 7d de diferenciación, los resultados en respuesta a glutamato, dopamina o GABA fueron similares a lo obtenido con las células hVM1 (ver tabla 3).

	hVM1	hVM1 high Bcl-X _L
KCl 60 mM	4,7 \pm 1,7	6,1 \pm 1,6
Dopamina 100 μ M	8,8 \pm 1,9	12,5 \pm 2,2
Glutamato 100 μ M	9,6 \pm 2,7	8,2 \pm 1,8
GABA 100 μ M	7,3 \pm 1,7	6,5 \pm 1,9

Tabla 3. Porcentaje de células que responden incrementando su $[Ca^{2+}]_i$ tras la aplicación de KCl, dopamina, glutamato o GABA en ambas líneas celulares diferenciadas 7d. Los datos muestran el porcentaje medio \pm SEM frente a células totales.

c) Oscilaciones periódicas espontáneas de calcio en células hVM1 high Bcl-X_L

El calcio intracelular juega un importante papel en la supervivencia y desarrollo de las neuronas del sistema nervioso central, así como en los mecanismos de transducción de señales. En cultivos primarios de neuronas de corteza de rata se observan potenciales de acción que se producen de forma espontánea y sincrónica, así como periódicamente, sin ninguna estimulación. Este fenómeno puede ser visualizado como cambios periódicos en la concentración intracelular de calcio (Kuroda et al., 1992). Las oscilaciones espontáneas en neuronas de mesencéfalo ventral se inhiben mediante la aplicación de antagonistas de los receptores de glutamato de tipo NMDA, lo que sugiere que las oscilaciones periódicas en cerebro medio requieren la neurotransmisión glutamatérgica para tener lugar (Yasumoto et al., 2004).

Dado que los cultivos de células hVM1 high Bcl-X_L diferencian generando un mayor número de neuronas dopaminérgicas, se eligieron estos cultivos para analizar la presencia de

oscilaciones espontáneas de calcio intracelular. Como se puede observar en la figura 20a, la concentración de calcio intracelular en esta línea celular a los 7d de diferenciación cambia espontáneamente en algunas células sin ninguna estimulación. El porcentaje de células que presentan oscilaciones espontáneas de $[Ca^{2+}]_i$ supone el $9,5 \pm 2.5\%$ del total de las células del cultivo. En la figura 20a se observa la variación en la ratio 340/380 de una célula representativa, que indica la presencia de oscilaciones espontáneas de calcio intracelular, frente al trazo uniforme observado en una célula inactiva, sin oscilaciones espontáneas en la concentración de calcio intracelular (figura 20b). Se definió que una célula presentaba oscilaciones espontáneas de calcio intracelular cuando los valores de ratio cambiaban en más del doble que las pequeñas variaciones del valor de ratio que se observan en la línea basal.

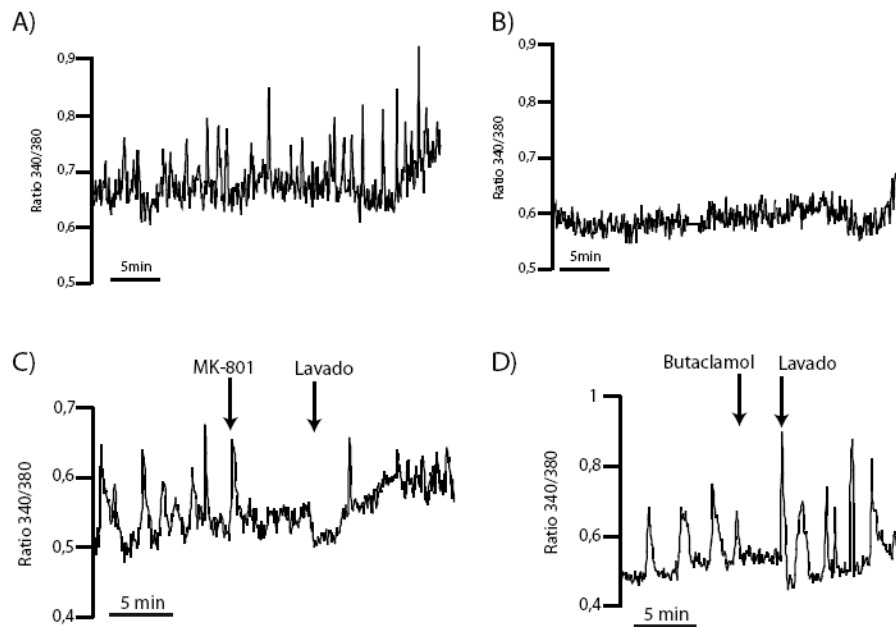


Fig. 20. Estudios de imagen de calcio con Fura2: oscilaciones periódicas espontáneas de calcio en las células hVM1 high Bcl-X_L

A) Línea ilustrando las variaciones en la ratio 340/380 de una célula hVM1 high Bcl-X_L a los 7 días de diferenciación, mostrando oscilaciones espontáneas de la concentración de calcio intracelular en ausencia de estímulos.

B) Ratio 340/380 de otra célula del mismo cultivo que el anterior sin oscilaciones en la concentración de calcio intracelular (célula quiescente).

C) Ratio de una célula hVM1 high Bcl-X_L diferenciada durante 7 días con oscilaciones espontáneas de calcio inhibidas por MK-801 50μM

D) Célula diferenciada durante 7 días con oscilaciones espontáneas de calcio inhibidas por butaclamol 100μM.

Se examinó el papel del glutamato y la dopamina endógenos sobre las oscilaciones espontáneas de $[Ca^{2+}]_i$. Los resultados muestran que algunas de las oscilaciones de calcio intracelular son inhibidas por la presencia de antagonistas de receptores de glutamato de tipo NMDA, como es el caso del MK-801 (figura 20c). En el total del cultivo, MK801 inhibe las oscilaciones espontáneas de calcio en un gran porcentaje de las células que las presentan

(63+/-8.5%). Sin embargo, el antagonista de receptores de glutamato de tipo AMPA (100 μ M NBQX), no produjo la inhibición de ninguna de las oscilaciones espontáneas de calcio intracelular estudiadas.

Además, se comprobó que la dopamina endógena estaba implicada en el mantenimiento de las oscilaciones espontáneas de calcio intracelular, a través de receptores de dopamina, ya que la adición del antagonista butaclamol (antagonista no selectivo de receptores de dopamina) produce la inhibición de las oscilaciones de calcio intracelular (figura 20d), muy probablemente ejerciendo su efecto al inhibir receptores de dopamina de tipo D1 como se ha descrito previamente en Yasumoto et al, 2004. Esta es una evidencia indirecta de que las células high Bcl-X_L son capaces de sintetizar dopamina y liberarla al medio, como ya se ha demostrado en estas mismas células mediante estudios de HPLC (Courtois et al., 2010; Villa et al., 2009)

En conclusión, los estudios de imagen de $[Ca^{2+}]_i$ demuestran que las neuronas generadas a partir de cultivos de hVM1 y hVM1 high Bcl-X_L están polarizadas, equipadas con VOCC, así como con los receptores de neurotransmisores apropiados, y que establecen una comunicación funcional entre ellas, de forma no distinguible a lo descrito en otros estudios en cultivos primarios de mesencéfalo ventral.

VII. **Electrofisiología.**

Las propiedades funcionales de las neuronas dopaminérgicas han sido ampliamente estudiadas tanto “in vivo” como “in vitro” durante las últimas décadas (Korotkova et al., 2004; Neuhoﬀ et al., 2002; Parish et al., 2008; Perrier and Studer, 2003; Richards et al., 1997; Tepper et al., 1987).

Lo primero fue estudiar la presencia de canales iónicos en ambas líneas celulares. Para ello se estudió la expresión de canales de calcio, sodio y potasio implicados en despolarización y repolarización durante los potenciales de acción y en la generación de oscilaciones espontáneas del potencial de membrana. Mediante estudios de expresión de proteínas (ver figura 21) pudimos determinar la presencia de canales de calcio dependientes de voltaje de

tipo N ($Ca_v2.2$), P/Q ($Ca_v2.1$) y L ($Ca_v1.2$); canales de sodio tipo Pan Na_v y de potasio $K_v3.4$ tanto en las células hVM1 como en las hVM1 high Bcl- X_L diferenciadas 30d.

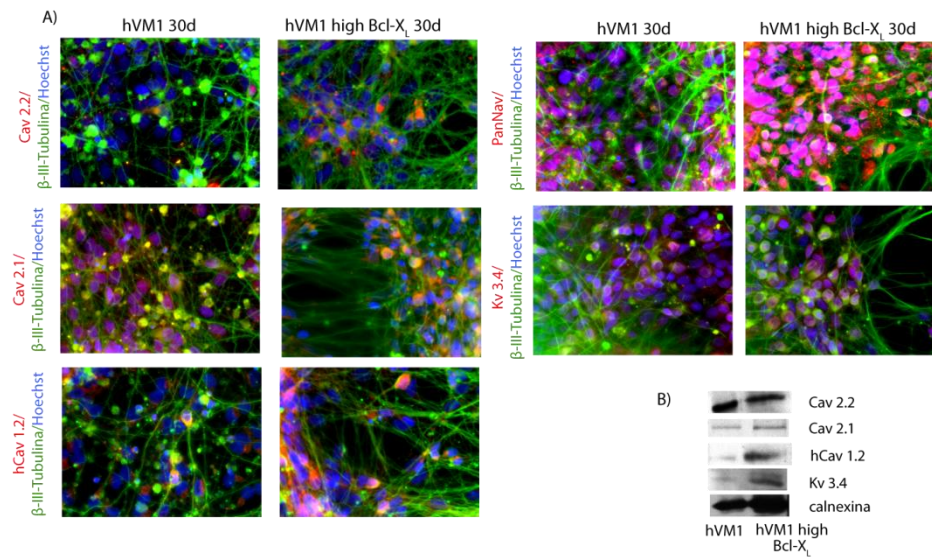


Fig. 21. Expresión de proteínas de canales de Ca^{2+} , Na^{2+} y K^{+} dependientes de voltaje en las células hVM1 y hVM1 high Bcl- X_L diferenciadas 30d. Mediante estudios de inmunocitoquímica (A) y western blot (B) pudimos determinar la presencia de canales de calcio dependientes de voltaje de tipo N ($Ca_v2.2$), P/Q ($Ca_v2.1$) y L ($Ca_v1.2$); canales de sodio tipo Pan Na_v y de potasio $K_v3.4$ (en rojo) en las neuronas (visualizadas en las imágenes en verde) generadas en los cultivos diferenciados 30d. Imágenes tomadas a 63x. Los núcleos fueron teñidos con Hoechst (azul). Para los estudios de *western blot* la proteína calnexina se utilizó como control de carga de los experimentos.

Los estudios de electrofisiología detallados en esta tesis se llevaron a cabo en colaboración con el laboratorio del Dr. Merab Kokaia (Wallenberg Neuroscience Center, Lund, Suecia) y con la ayuda del Dr. Jan Tønnesen. En este estudio se analizaron cultivos celulares de las líneas hVM1 y hVM1 high Bcl- X_L desde los 5 a los 32 días de diferenciación (Tonnesen et al., 2010). Los experimentos de *whole-cell patch clamp* que se llevaron a cabo permitieron identificar dos subpoblaciones de células presentes durante la diferenciación en ambas líneas celulares (figura 22). No se pudo determinar el fenotipo de las células analizadas debido a que aunque se les inyectó biocitina durante los registros electrofisiológicos, ésta difundió durante la inmunocitoquímica, perdiéndose la marca de las células analizadas. Una de las dos poblaciones encontradas posee propiedades de membrana activas, capaz de generar potenciales de acción tras su estimulación con distintos voltajes, lo que es funcionalmente identificable con un fenotipo neuronal; mientras que en la otra subpoblación dichas propiedades de membrana son pasivas, propio de su naturaleza glial.

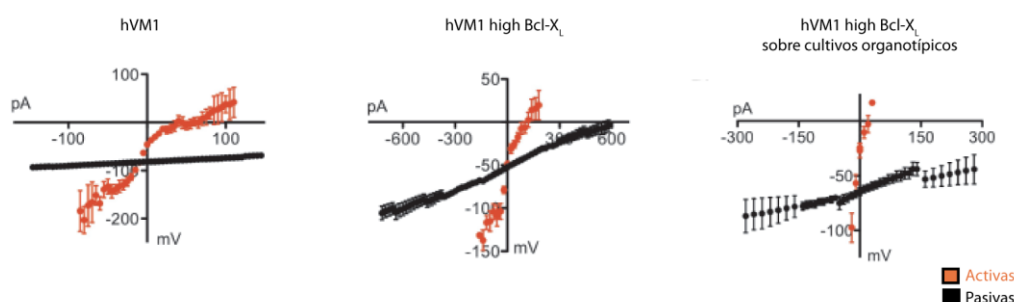


Fig. 22. Diferentes propiedades de membrana observadas en las células analizadas mediante *whole cell patch-clamp*.

Los experimentos de *whole-cell patch clamp* que se llevaron a cabo en las células hVM1, hVM1 high Bcl-X_L y hVM1 high Bcl-XL sobre cultivos organotípicos, permitieron identificar dos subpoblaciones de células presentes durante la diferenciación en ambas líneas celulares. Una posee propiedades de membrana activas (naranja) y es capaz de generar potenciales de acción tras su estimulación con distintos voltajes, lo que es funcionalmente identificable con un fenotipo neuronal; mientras que en la otra subpoblación (negro) dichas propiedades de membrana son pasivas, propio de su naturaleza glial.

Mediante registros electrofisiológicos de los cultivos de células hVM1 encontramos que el 68% de las células analizadas (37 de 54) muestran una actividad de membrana plasmática que concuerda con un fenotipo neuronal (figura 23a). En ninguna de las células analizadas se observó actividad sináptica a través de la membrana plasmática. El 43% del total de células analizadas muestran potenciales de acción inmaduros tras la estimulación con corrientes despolarizantes (crecientes en 5pA cada vez) y también tras la rectificación del potencial de membrana en respuesta a la aplicación de corrientes hiperpolarizantes. Una de las células analizadas tras 19d de diferenciación (figura 23b) mostró potenciales de acción espontáneos, que tras la aplicación de corrientes despolarizantes incrementan en frecuencia hasta desatar un tren de potenciales de acción. Durante la diferenciación de los cultivos se produce una disminución significativa en el potencial de membrana en reposo que varía desde los $-65,4 \pm 4,5$ mV a 20d a unos $-41,6 \pm 7,3$ mV a los 32d de diferenciación (figura 23c), indicando una disminución en la integridad de la membrana celular según avanza la diferenciación. Esta disminución no va acompañada con cambios significativos en la resistencia de entrada (*input resistance* Ri) cuyo valor medio no presenta diferencias significativas entre los 20 y los 32d de diferenciación.

De las 54 células analizadas, las 16 restantes muestran propiedades pasivas de la membrana plasmática (figuras 22 y 23d). En ellas también se observa una disminución significativa del potencial de membrana en reposo con los días de diferenciación, mientras que la Ri permanece inalterada con el tiempo en cultivo. Los valores tan elevados del potencial de membrana en reposo (cerca de -80 mV), la ausencia de rectificación de dicho potencial tras la hiperpolarización de estas células y su baja Ri nos identifican funcionalmente a estas células como células gliales.

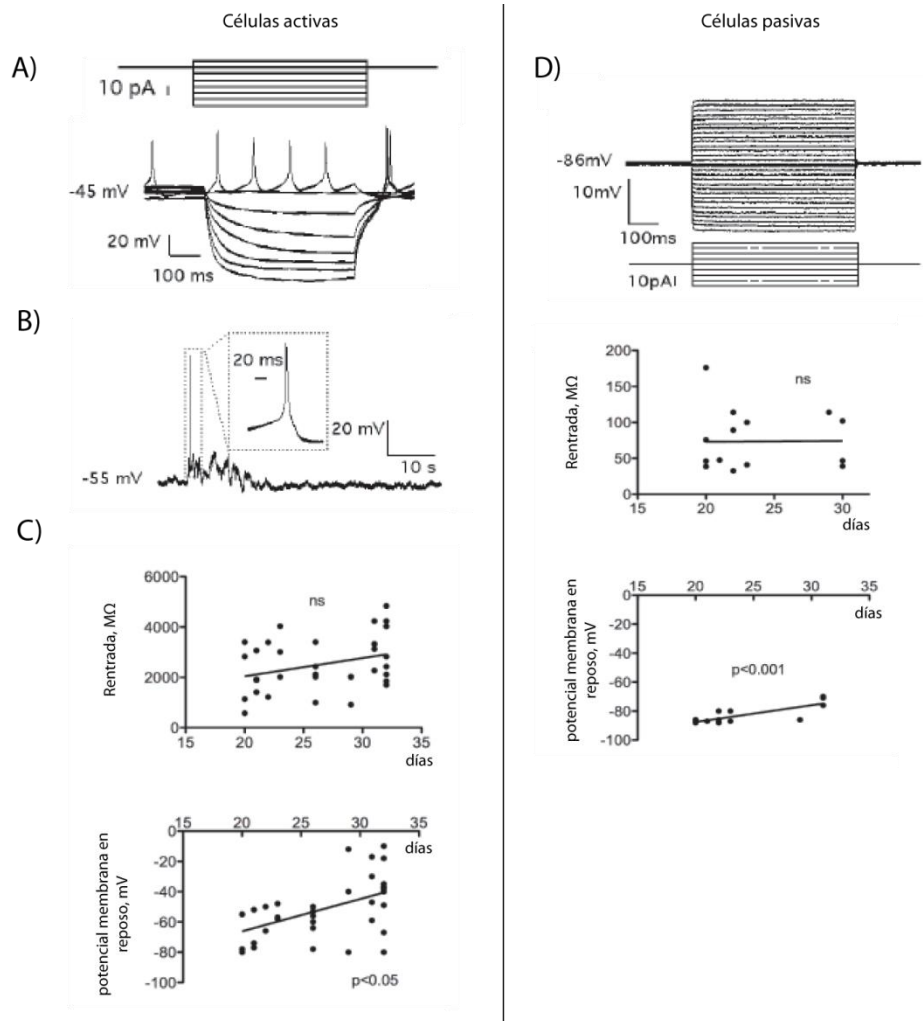


Fig. 23. Propiedades electrofisiológicas de los cultivos diferenciados de la línea hVM1.

A) Ejemplo de célula que muestra una actividad de membrana plasmática que concuerda con un fenotipo neuronal. En ninguna de las células analizadas se observó actividad sináptica a través de la membrana plasmática. El 43% del total de células analizadas muestran potenciales de acción inmaduros tras la estimulación con corrientes despolarizantes (crecientes en 5pA cada vez) y también tras la rectificación del potencial de membrana en respuesta a la aplicación de corrientes hiperpolarizantes.

B) Ejemplo de un potencial de acción espontáneo, que tras la aplicación de corrientes despolarizantes incrementa en frecuencia hasta desatar un tren de potenciales de acción.

C) Gráficas que muestran como disminuye significativamente en el potencial de membrana en reposo durante la diferenciación de los cultivos.

D) Ejemplo de una célula con propiedades pasivas de membrana plasmática que concuerda con un fenotipo glial.

En el caso de las células hVM1 high Bcl-X_L el 75% (58 de 77 células analizadas) muestran una actividad de la membrana plasmática que indica de nuevo su naturaleza neuronal (figura 24a). Las células activas no presentan ni potenciales de acción ni corrientes sinápticas espontáneas. Tras la aplicación de corrientes despolarizantes (con un incremento de 5pA cada vez) a los 9-12d de diferenciación observamos la aparición de picos similares a un potencial de acción, bloqueables por TTX (tetrodotoxina) (figura 24b) que impide la despolarización de las células ya que actúa bloqueando canales de Na²⁺. Viendo que los picos observados mediante la aplicación de corrientes despolarizantes desaparecen tras el

tratamiento de los cultivos con TTX, podemos decir que los picos correspondían a potenciales de acción inmaduros. El potencial de membrana en reposo en este tipo celular aumenta con los días de diferenciación significativamente (ver figura 24c) pasando de $-42,01 \pm 2,3 \text{ mV}$ a 5d a los $-58,32 \pm 3,5 \text{ mV}$ a los 12 de diferenciación. Este tipo celular parece que no pierde propiedades de la membrana plasmática con el paso de los días en cultivo. Este cambio no va acompañado con fluctuaciones en la resistencia de entrada (R_i) cuyo valor medio no presenta diferencias significativas entre los 5 y los 12d de diferenciación.

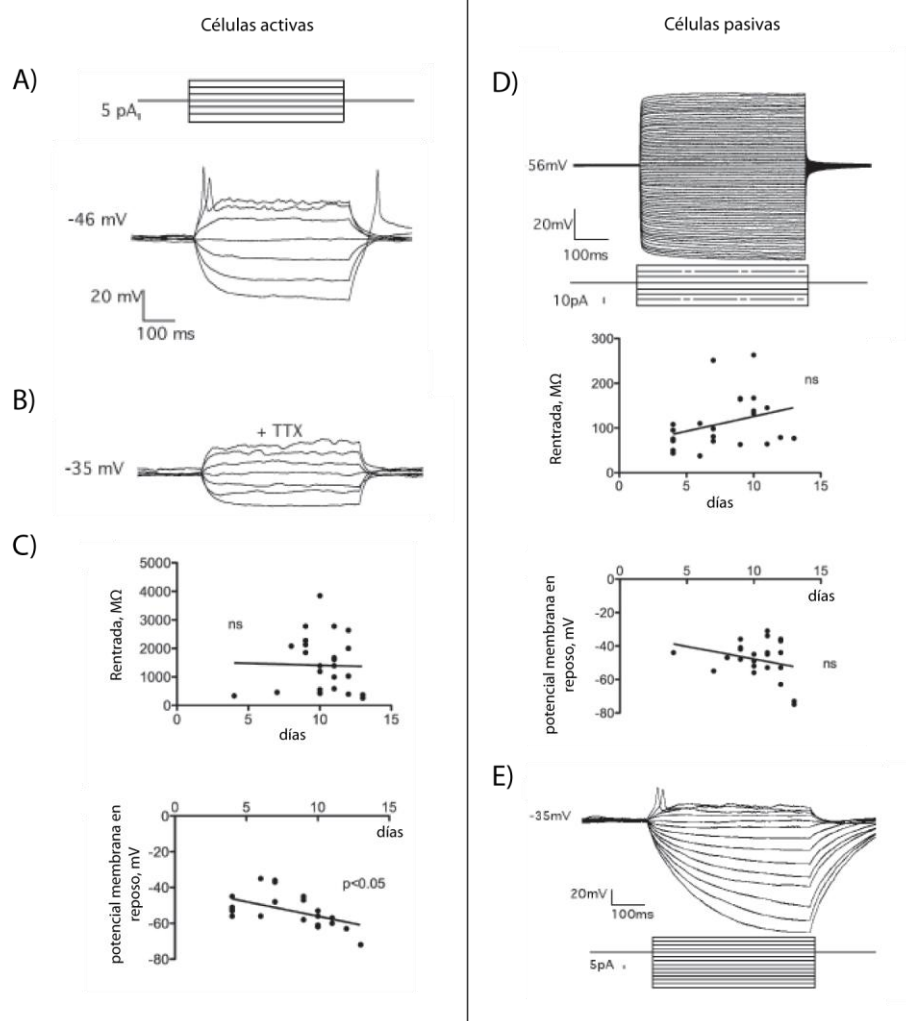


Fig. 24. Propiedades electrofisiológicas de los cultivos diferenciados de la línea hVM1 high Bcl-X_L.

A) Ejemplo de célula que muestra una actividad de membrana plasmática que concuerda con un fenotipo neuronal. En ninguna de las células analizadas se observó actividad sináptica a través de la membrana plasmática. El 75% del total de células analizadas muestran potenciales de acción inmaduros tras la estimulación con corrientes despolarizantes (crecientes en 5pA cada vez) y también tras la rectificación del potencial de membrana en respuesta a la aplicación de corrientes hiperpolarizantes.

B) Ejemplo de un potencial de acción inmaduro bloqueable por TTX (tetrodotoxina).

C) El potencial de membrana en reposo en este tipo celular aumenta con los días de diferenciación significativamente. Este tipo celular parece que no pierde propiedades de la membrana plasmática con el paso de los días en cultivo.

D) Ejemplo de una célula con propiedades pasivas de membrana plasmática que concuerda con un fenotipo glial.

E) Ejemplo de célula con propiedades activas de membrana diferenciada sobre cultivos organotípicos 66d. Se registraron potenciales de acción inmaduros tras la despolarización de las células, pero no se detectaron potenciales de acción espontáneos ni actividad sináptica.

El 25% de células restantes pertenecen a células con propiedades pasivas de la membrana plasmática (ver figura 24d). En ellas a diferencia de lo obtenido en cultivos de células hVM1, no se observa un aumento del potencial de membrana en reposo con los días de diferenciación. Tampoco presentan cambios en la resistencia de entrada.

Los cultivos de hVM1 high Bcl-X_L no pudieron ser analizados a más de 15d de diferenciación debido a problemas de adhesión y muerte celular en las condiciones utilizadas para estos experimentos de electrofisiología. Para intentar alcanzar un mayor grado de diferenciación de las células hVM1 high Bcl-X_L, éstas fueron transfectadas con un potente lentivirus-GFP e implantadas sobre cultivos organotípicos de estriado de ratón. Las células fueron analizadas electrofisiológicamente a los 11, 40 y 66d de diferenciación encontrando igualmente células activas y pasivas. Dentro de las células activas después de 66d de diferenciación se registraron potenciales de acción inmaduros tras la despolarización de las células estudiadas (figura 24e). No se detectaron potenciales de acción espontáneos ni actividad sináptica, pero cabe destacar la larga duración (mayor de 2mseg) de los potenciales de acción encontrados, típica de las neuronas dopaminérgicas del tipo A9.

En resumen, los cultivos de células hVM1 y hVM1 high Bcl-X_L diferenciados “in vitro” presentan propiedades electrofisiológicas típicas de fenotipos neuronales y gliales. Dentro de las pertenecientes al fenotipo neuronal encontramos potenciales de acción inmaduros tras la despolarización de las células y la rectificación del potencial de membrana tras su hiperpolarización. Únicamente una de las células analizadas perteneciente a los cultivos de hVM1 fue capaz de desencadenar trenes de potenciales de acción tras ser despolarizada, proporcionando evidencia del potencial de los cultivos para alcanzar propiedades neuronales típicas de neuronas mesencefálicas.

2. MARCAJE “IN VITRO” DE CÉLULAS TRONCALES NEURALES CON NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS PARA SU DETECCIÓN Y SEGUIMIENTO MEDIANTE IRM.

El objetivo de esta sección del trabajo de tesis doctoral fue encaminado a desarrollar las herramientas necesarias para el análisis funcional, en el animal vivo, de las neuronas dopaminérgicas generadas desde hNSCs (células troncales neurales humanas) tras su trasplante en el cerebro de roedor. Para ello es necesario combinar al menos dos técnicas de neuroimagen: una que permita conocer la localización física de las células trasplantadas (imagen de resonancia magnética (IRM) previo marcaje de las células) en el animal vivo, y otra que revele aspectos funcionales de las neuronas supuestamente generadas en él a partir de los trasplantes de hNSCs (imagen de emisión de positrones (PET)).

El seguimiento mediante IRM de las células trasplantadas se ha convertido recientemente en una técnica de gran utilidad para la realización de experimentos basados en reemplazamiento celular con futuras aplicaciones en enfermedades neurodegenerativas. La utilización de IRM para la detección de células trasplantadas en ratas hemiparkinsonianas necesita que las células utilizadas en los trasplantes sean marcadas previamente con un agente de contraste que permita obtener la imagen *in vivo*, como las nanopartículas superparamagnéticas (NNP). Estos estudios nos permitirían la identificación de la región del cerebro donde se localiza el trasplante en el animal vivo. Los estudios de IRM se llevaron a cabo en el Instituto Pluridisciplinar de la Universidad Complutense de Madrid. Por otra parte, el PET es probablemente la técnica más potente para el estudio *in vivo* de procesos biológicos en animales de laboratorio, al permitir mediciones funcionales y cuantitativas de forma no invasiva, así como la realización de estudios longitudinales. Esta modalidad de imagen permite estudiar, visualizar y cuantificar múltiples procesos bioquímicos y fisiológicos tales como metabolismo glicolítico, tasa de síntesis proteica, proliferación celular, actividad enzimática, tasa de consumo de oxígeno, metabolismo β -oxidativo, pH intracelular, flujo sanguíneo, transmisión de señales, expresión génica y su regulación, entre otros. En estos estudios es necesario administrar un radiofármaco, es decir, una molécula implicada en alguna función fisiológica que se marca con un radioisótopo emisor de positrones, que en su desintegración emite radiación gamma que puede detectarse y cuantificarse en el tomógrafo. Estos estudios se llevaron a cabo en el Centro de Investigaciones Médico Sanitarias (CIMES) de la Universidad de Málaga. Este centro cuenta con un módulo de metilación con ^{11}C Carbono (TracerLab FC) en el que se puede sintetizar ^{11}C -Dihidrotetabenazina (^{11}C -DHTBZ), que permite el estudio de pérdidas neuronales en enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de

Parkinson, la atrofia multi-sistema, desórdenes del sueño (Fase REM), y la determinación de densidad neuronal mediante PET.

Para alcanzar estos objetivos, comenzamos el trabajo de puesta a punto del marcaje de células hNSCs derivadas de mesencéfalo ventral con NNPs. Datos previos presentados en esta memoria y otros resultados obtenidos en nuestro laboratorio por la Dra. Elise Courtois (como el mantenimiento de las propiedades de mesencéfalo ventral, funcionalidad *in vitro*, buena expansión y alta supervivencia en cultivo, alto rendimiento en la generación de neuronas dopaminérgicas y propiedades ventajosas de maduración en experimentos *in vivo* respecto de otras líneas hNSCs) determinaron que nos centráramos en el uso de la línea celular hVM1 high Bcl-X_L para poner en marcha este estudio.

I. Marcaje *in vitro* de las células hVM1 high Bcl-X_L: establecimiento de las condiciones óptimas de marcaje y propiedades de los cultivos marcados.

a) Establecimiento de las condiciones óptimas de marcaje.

i) Tipo de NNP, tratamiento y tiempo de incubación.

El primer aspecto que se estudió fue la combinación óptima entre el tipo de NNP utilizado, la necesidad o no de un tratamiento previo con agentes químicos que faciliten su incorporación a las células y la concentración a usar, con el objetivo de obtener el mayor número de células marcadas y con el mayor número posible de NNP en su interior sin que se viese afectada su viabilidad.

Las células en condiciones de proliferación fueron expuestas a diferentes tipos de NNP (según el tamaño del núcleo de hierro, su cobertura de dextrano y fluorescencia son: 250-Dx, 50-Dx y 100-Dx-R) a concentraciones de 50, 100 y 300 µgFe/ml de medio de cultivo respectivamente; siendo las NNP sin tratar o pre-tratadas (cubiertas) con poli-lisina (PLL) o protamina (PTM) y sometidas a periodos de incubación de 3, 6, 24 y 72h. La PLL (pequeño polipéptido formado por 25-30 residuos de L-lisina) y la PTM (péptido pequeño derivado del esperma de salmón, rico en argininas) son péptidos altamente catiónicos que pueden interaccionar con la cobertura de dextrano (polisacárido complejo y ramificado formado por numerosas moléculas de glucosa) de las NNP. La hipótesis detrás de llevar a cabo este recubrimiento es que el tratamiento con PLL o PTM conferiría a las NNP una carga positiva. De esta manera se adherirían más fácilmente a la membrana plasmática de las células (carga negativa) y se internalizarían con mayor efectividad.

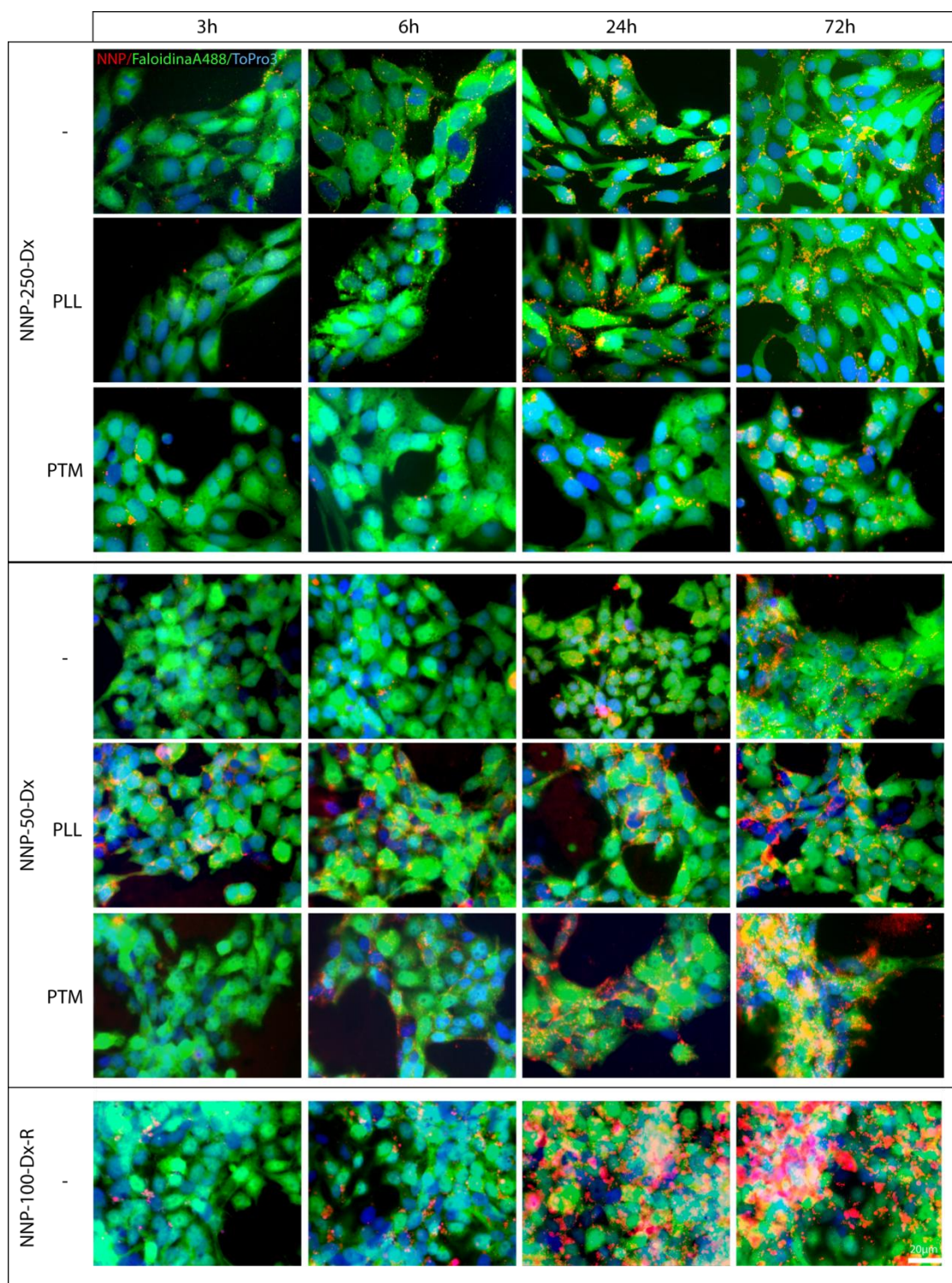


Fig. 25. Incubación de los cultivos de células hVM1 high Bcl-X_L con diferentes tipos de NNP, tratamientos y tiempos de incubación.

Las células en condiciones de proliferación fueron incubadas con diferentes tipos de NNP (según el tamaño del núcleo de hierro, su cobertura de dextrano y fluorescencia son: 250-Dx, 50-Dx y 100-Dx-R) a una concentración de 50µgFe/ml de medio de cultivo; estando las NNP sin tratar o pre-tratadas (cubiertas) con poli-lisina (PLL) o protamina (PTM) y mantenidas durante 3, 6, 24 ó 72h en el medio de cultivo. Las fotografías muestran imágenes de inmunofluorescencia en las que observamos el contorno celular (Faloidina A888, verde), su núcleo (ToPro3, azul) y las NNP (rojo) que se encuentran en su interior tras las distintas condiciones testadas. Barra de escala=20µm.

Como se puede ver en las figuras 25 y 26 la cantidad de NNP incorporadas a las células aumenta progresivamente según aumenta el tiempo de incubación en todas las condiciones estudiadas. El tiempo de incubación óptimo para obtener un elevado número de células marcadas utilizando una concentración de NNP de 50µg/ml es de 24 a 72h, alcanzando finalmente un nivel de marca superior al 90% de las células totales del cultivo.

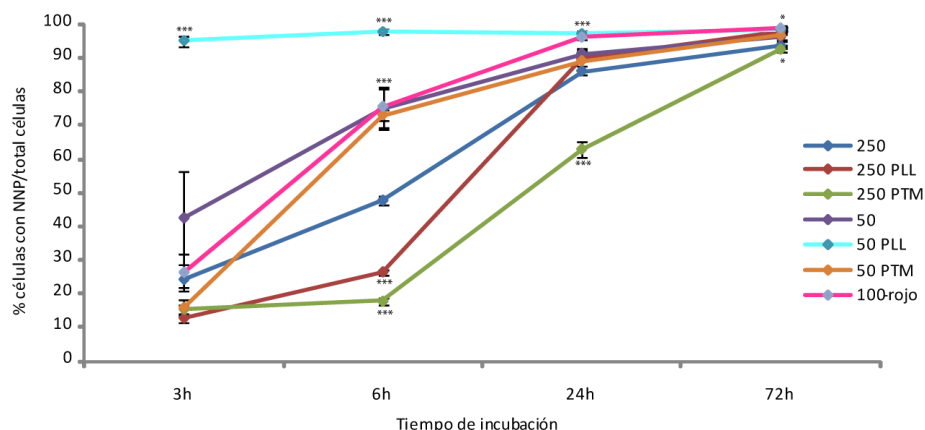


Fig. 26. Porcentaje de células hVM1 high Bcl-X_L que incorporan NNP en su interior tras su incubación bajo diferentes condiciones.

Las células en condiciones de proliferación fueron incubadas con diferentes tipos de NNP (según el tamaño del núcleo de hierro, su cobertura de dextrano y fluorescencia son: 250-Dx, 50-Dx y 100-Dx-R) a una concentración de 50µgFe/ml de medio de cultivo; estando las NNP sin tratar o pre-tratadas (cubiertas) con poli-lisina (PLL) o protamina (PTM) y mantenidas durante 3, 6, 24 ó 72h en el medio de cultivo. Los datos de la gráfica muestran el porcentaje medio \pm ESM de células marcadas con NNP frente al número total de células del pocillo (n=4). (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; Tukey's Kramer test). * Significativamente distinto a 250nm a igual periodo de incubación.

En el caso de NNP de gran tamaño (250-Dx) observamos que ni la PLL ni la PTM mejoran la dinámica temporal de captura de las NNP. Sólo tras 72h de incubación se obtiene más de un 90% de marcaje. Con este tipo de NNP la mejor elección sería más de 24h de incubación con NNP-250-Dx+PLL ya que así se obtienen un $98,01 \pm 0,8\%$ de las células marcadas y un mayor número de NNP en el interior de cada célula. Al estudiar partículas más pequeñas (NNP-50-Dx) vemos como el tratamiento con PLL favorece la internalización de las NNP desde las 3h de incubación. Sin embargo, aunque la PTM no parece mejorar la dinámica de captura de las NNP en el tiempo (frente a PLL o sin tratamiento), este tratamiento resulta ser el más eficaz ya que tras 72h de incubación con NNP-50-Dx+PTM obtenemos un $98,5 \pm 1,07\%$ de células marcadas y con mayor cantidad de NNP en su interior que utilizando partículas sin tratar o con PLL. Finalmente, si nos centramos en las partículas de tamaño medio (NNP-100-Dx-R) observamos que tienen una dinámica de internalización muy similar a las NNP-50-Dx+PTM. De estos experimentos se concluye por tanto que no es necesario tratar estas NNP con PLL o PTM, ya que tras 72h de incubación las células alcanzan un elevado porcentaje de marcaje total ($98,68 \pm 0,68\%$) e individual de las células.

Además, es importante destacar que las células marcadas presentan una morfología y una disposición de cultivo normal.

ii) *Viabilidad celular.*

Paralelamente, se determinaron mediante ensayos de viabilidad celular (MTT) e inmunofluorescencia las concentraciones y los tratamientos ideales (resultantes en menor o ninguna toxicidad) para cada tipo de NNP, con un tiempo de incubación de 72h. El MTT es un ensayo colorimétrico que se basa en la reducción del bromuro de 3-(4,5-dimetilthiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazol (amarillo) a formazán (morado). Esto ocurre cuando las enzimas reductasas de la célula viva se encuentran activas, indicando la proporción de células vivas del cultivo.

Con todas las NNP (250-Dx, 50-Dx y 100-Dx-R) utilizadas se observó una disminución significativa en la viabilidad celular al utilizar concentraciones de 100 ó 300µgFe/ml (ver figura 27). Si nos fijamos en la figura 27a, podemos observar cómo al utilizar concentraciones de 100 o 300 µgFe/ml tanto con las NNP-50-Dx+PTM como con las NNP-100-Dx-R, además de disminuir el número de células por campo, disminuye la señal de la faloidina (F-actina) y aparecen núcleos celulares con una morfología apoptótica (núcleos pequeños y condensados), indicando la existencia de células dañadas o muertas en los cultivos. Por ello, en el resto de experimentos se optó por utilizar una concentración de 50µgFe/ml de medio.

En el caso de las NNP-250-Dx, a una concentración de 50µgFe/ml y 48h de incubación, no existen diferencias significativas a nivel de viabilidad celular cuando se utilizan sin tratamiento o pre-tratadas con PLL o PTM. Para las NNP-50-Dx (figura 27b) vemos una disminución significativa en la viabilidad celular al tratarlas previamente con PLL. A la hora de mejorar el marcaje cuando utilizamos este tipo de NNP, se optó por utilizar la condición de NNP-50-Dx+PTM a una concentración de 50µgFe/ml. En el caso de las NNP-100-Dx-R no es necesario el pre-tratamiento con ningún agente para que el rendimiento de marcaje sea óptimo.

Podemos concluir a la vista de estos resultados que las NNP-250-Dx serán descartadas para estudios posteriores, ya que su elevado tamaño disminuye el número de NNP internalizadas en cada célula y surgen dudas de si podrían interferir en la funcionalidad celular.

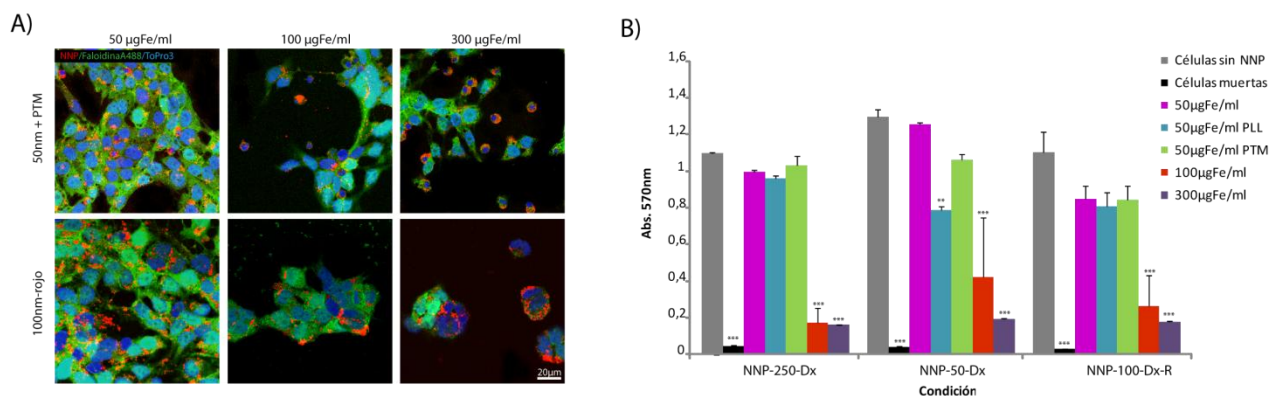


Fig. 27. Tratamiento de los cultivos de células hVM1 high Bcl-X_L con distintos tipos de NNP a distintas concentraciones.

A) Imágenes de inmunofluorescencia que muestran el estado de los cultivos tras su incubación 48h con NNP-50-Dx+PTM o NNP-100-Dx-R a concentraciones de 100 o 300 µgFe/ml. Con concentraciones superiores a los 100 µgFe/ml disminuye el número de células que quedan en los cultivos y aparecen núcleos celulares con una morfología apoptótica.

B) Resultado de los estudios de viabilidad celular mediante medida de MTT en los cultivos de células hVM1 high Bcl-X_L tratados con distintos tipos de NNP, pre-tratadas o no con PLL o PTM y aplicadas a distintas concentraciones. Los datos se comparan al valor de absorbancia obtenido en cultivos llevados en paralelo de células sin tratar y sometidas a una muerte celular por exposición a SDS10%. Con todas las NNP (250-Dx, 50-Dx y 100-Dx-R) utilizadas se observó una disminución significativa en la viabilidad celular al utilizar concentraciones de 100 ó 300 µgFe/ml. Los datos de la gráfica muestran el valor medio ± ESM de la absorbancia detectada para cada condición (n=4). (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; Tukey's Kramer test). * Significativamente distinto del valor de las células sin marcar en cada caso.

Los buenos resultados obtenidos con las NNP-50-Dx+PTM y con las NNP-100-Dx-R sin tratar con ningún agente químico (ambas a una concentración de 50 µgFe/ml), y la ausencia de toxicidad de estas NNP examinada mediante el ensayo de MMT, nos hizo elegir estos dos tipos de NNP para estudios posteriores.

Resumiendo, podemos concluir después de estos experimentos que para el marcaje *in vitro* de las células hVM1 high Bcl-X_L las condiciones óptimas son: más de 24h de incubación (72h), una concentración de 50 µgFe/ml de medio y un tratamiento previo con PTM para las NNP-50-Dx y sin tratamiento en el caso de las NNP-100-Dx-R.

b) Validación de los cultivos hVM1 high Bcl-X_L marcados con NNP.

Previamente a su utilización en trasplantes en ratas hemiparkinsonianas, el uso de NNP en las células hVM1 high Bcl-X_L fue validado, evaluando si las NNP afectaban o no al desarrollo de los cultivos celulares tanto a nivel de ciclo celular como de diferenciación fenotípica.

i) *Efectos de las NNP en el ciclo celular de hNSCs de mesencéfalo ventral.*

El análisis de ciclo celular por citometría de flujo permite la cuantificación del porcentaje de células presentes en cada fase del ciclo celular. Las células hVM1 high Bcl-X_L en proliferación presentan una proporción típica de cualquier cultivo primario de células presentes en cada fase del ciclo celular, mostrando a las 24h una mayoría de células en fase G0-G1 (50%), un 30% en fase S y un menor porcentaje en fase G2-M (13%), correspondiente a células que se encuentran en fase mitótica activa. . En el caso de cultivos que han estado 48h en condiciones proliferativas, aumenta en un 2% la proporción de células en fase G0-G1 (primera fase del ciclo en la que existe crecimiento celular con síntesis de proteínas y de ARN, transcurre entre el fin de una mitosis y el inicio de la síntesis de ADN) y disminuye en un 6% la cantidad de células en fase S (segunda fase del ciclo en la que se produce la replicación o síntesis del ADN) frente a cultivos que sólo han permanecido 24h en dichas condiciones. Estas pequeñas diferencias se atribuyen a que tras 24 o 48h las células analizadas se encuentran en distintos periodos del ciclo celular, debido al estrés que supone la tripsinización y re-siembra y a que se completa un ciclo cada 20h (tesis Dra. Elise Courtois 2008). Además, con esta técnica se pueden detectar las células apoptóticas ya que la fragmentación del ADN que ocurre durante el proceso de apoptosis hace que estas células aparezcan en una fracción diferente (SubG0) al resto de las fases del ciclo celular.

Al comparar células sin marcar con células marcadas con NNP (incubadas durante 24 ó 48h con NNP-100-Dx a 50µgFe/ml), no se encuentran diferencias significativas en la distribución de células en cada fase del ciclo celular (ver figura 28). Por tanto se puede concluir que el tratamiento con estas NNP no afecta al ciclo celular de las hVM1 high Bcl-X_L. Sin embargo, si se observan diferencias significativas entre cultivos celulares que han permanecido 24 ó 48h en condiciones de proliferación, pero dichas diferencias no están relacionadas con su marcaje con NNP. La ausencia de células con una complejidad de ADN menor que la que existe en la fase G0-G1 (SubG0), indica que las NNP a la concentración utilizada no están produciendo apoptosis en los cultivos celulares, como ya se comprobó en el apartado de viabilidad celular.

RESULTADOS

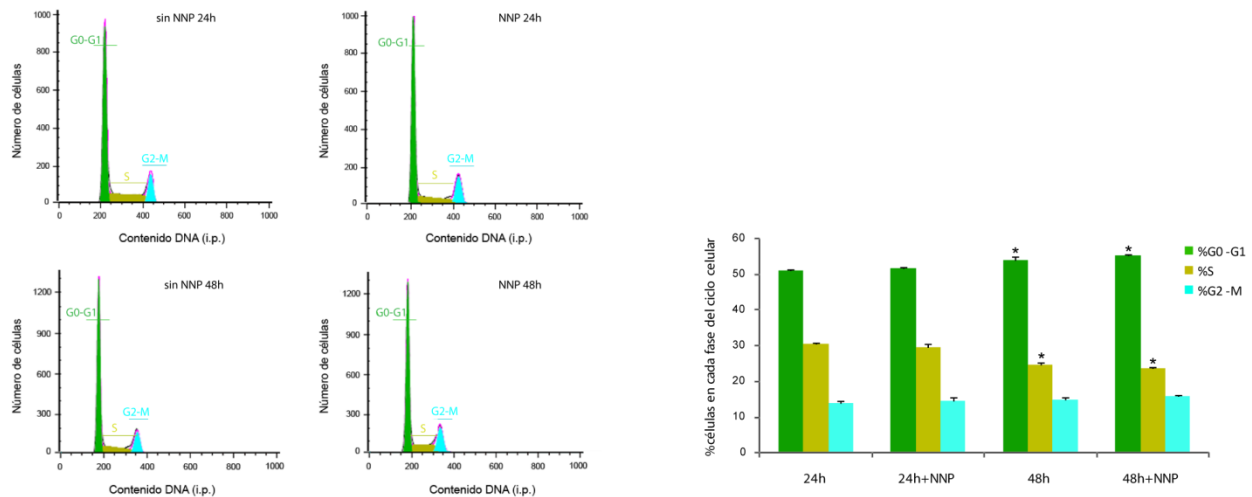


Fig. 28. El análisis de ciclo celular por citometría de flujo de las células hVM1 high Bcl- X_L tras 24 y 48h en proliferación de cultivos sin tratar e incubados con NNP-100-Dx a 50 μ gFe/ml. Como muestran los paneles de la izquierda, la distribución de células en cada fase del ciclo celular es muy similar en los cuatro casos. Las células hVM1 high Bcl- X_L en proliferación presentan una proporción típica de cualquier cultivo primario, mostrando a las 24h una mayoría de células en fase G0-G1 (50%), un 30% en fase S y un menor porcentaje en fase G2-M (13%), correspondiente a células que se encuentran en fase mitótica activa. Las diferencias que se observan en el porcentaje de células en G0-G1 y fase S entre 24 y 48h no se deben a la presencia o no de NNP. Los datos de la gráfica muestran el porcentaje medio \pm ESM de células presentes en cada fase del ciclo celular ($n=3$). (* $p<0,05$ ANOVA, Tukey's Kramer test). * Significativamente distinto a su valor en igual condición a 24h.

ii) *Efecto de las NNP en el proceso de diferenciación de hNSCs.*

Una vez comprobado que las NNP utilizadas en las condiciones anteriormente descritas no afectaban ni a la viabilidad ni al ciclo celular, se procedió a evaluar si tenían algún efecto sobre diferenciación fenotípica. Primero se evaluó si las NNP afectaban la naturaleza de “neural stem” de las células, estudiando la presencia de nestina a 0 días (proteína que forma parte de los filamentos intermedios y que es utilizada como marcador para identificar las células progenitoras del sistema nervioso central). Como se observa en la figura 29, no hay diferencias significativas en el porcentaje de células nestina positivas (cercano al 100%) en las células hVM1 high Bcl- X_L marcadas con NNP-50-Dx+PTM ó 100-Dx-R, frente a células sin marcar. Posteriormente se evaluó la capacidad de diferenciación de los cultivos marcados con NNP. Para ello, células hVM1 high Bcl- X_L sin marcar o marcadas con NNP 50-Dx+PTM o 100-Dx-R durante 48h a 50 μ gFe/ml y diferenciadas 7d fueron analizadas mediante inmunofluorescencia para determinar los porcentajes de expresión de neuronas (β -III-Tubulina), células gliales (GFAP) y neuronas dopaminérgicas (TH) frente a células totales. Como se puede ver en la figura 29, las NNP no interfieren en la diferenciación normal de estos cultivos celulares, manteniéndose los porcentajes de cada fenotipo celular sin cambios

significativos respecto de lo observado para células sin marcar. Además, los tres fenotipos celulares son capaces de incorporar/retener NNP, sin que se observe que ninguno de ellos lo haga con mayor o menor eficacia.

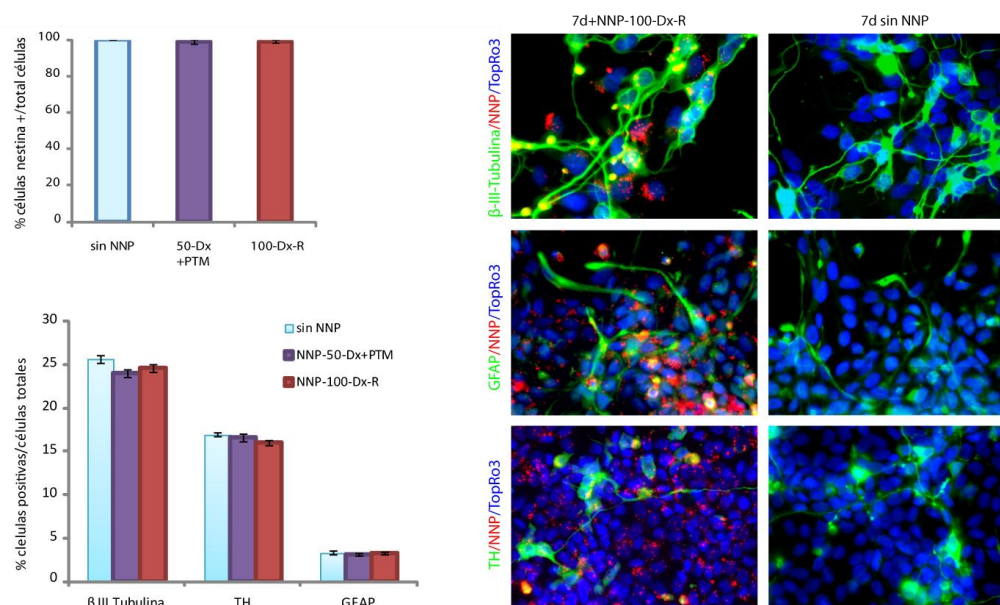


Fig. 29. Diferenciación de los cultivos marcados con NNP.

El panel de la izquierda muestra los porcentajes de células nestina (a 0d) y β -III-Tubulina, TH y GFAP (a 7d) generadas a partir de cultivos de células hVM1 high Bcl- X_L marcados o sin marcar con $50\mu\text{gFe/ml}$ de NNP-50-Dx y NNP-100-Dx-R. A la derecha podemos ver imágenes de microscopía de fluorescencia de cultivos de esta línea celular sin tratar o marcados con NNP-100-Dx-R (en rojo) diferenciados 7d que muestran la expresión de proteínas típicas de neuronas (β -III-Tubulina), glía (GFAP) o neuronas dopaminérgicas (TH) (en verde). Los núcleos se muestran en azul, aunque fueron teñidos utilizando ToPro3 (rojo lejano). Las NNP no interfieren en la diferenciación normal de estos cultivos celulares, manteniéndose los porcentajes de cada fenotipo celular sin cambios significativos respecto de lo observado para células sin marcar. Los datos de la gráfica muestran el porcentaje medio \pm ESM de células de cada fenotipo respecto del número total de células ($n=3$). (* $p<0,05$ ANOVA, Tukey's Kramer test). Imágenes a 63x.

En conclusión podemos decir que el marcaje con NNP no altera la multipotencia de las hNSC ni sus decisiones de linaje. Los progenitores en proliferación captan la marca y, muy posiblemente mediante divisiones asimétricas, ésta se distribuye uniformemente entre toda su progenie.

II. Internalización de las NNP.

El siguiente punto esencial en la validación fue comprobar que las NNP penetran realmente en las células y no se quedan simplemente adheridas a su superficie, lo que disminuiría su eficacia para el marcaje y seguimiento mediante IRM de células trasplantadas.

Para ello células hVM1 high Bcl-X_L marcadas durante 48h (50µgFe/ml) con NNP-50-Dx+PTM o NNP-100-Dx-R y diferenciadas 4d fueron fijadas y teñidas con un anticuerpo contra dextrano, con faloidina Alexa488 (para marcar los microfilamentos de actina y ayudar a identificar el contorno celular) y TopRo3 para teñir los núcleos. Las preparaciones se analizaron mediante microscopía confocal para determinar la localización celular de las NNP. Como se observa en la figura 30 mediante proyecciones ortogonales se pudo demostrar cómo las NNP en ambos casos se encuentran en el citoplasma celular. El marcaje en rojo de las NNP se observa entremezclado y rodeado del de faloidina (verde) que marca el citosol y en el mismo plano del núcleo (azul) cuando nos centramos en una misma sección de microscopía confocal.

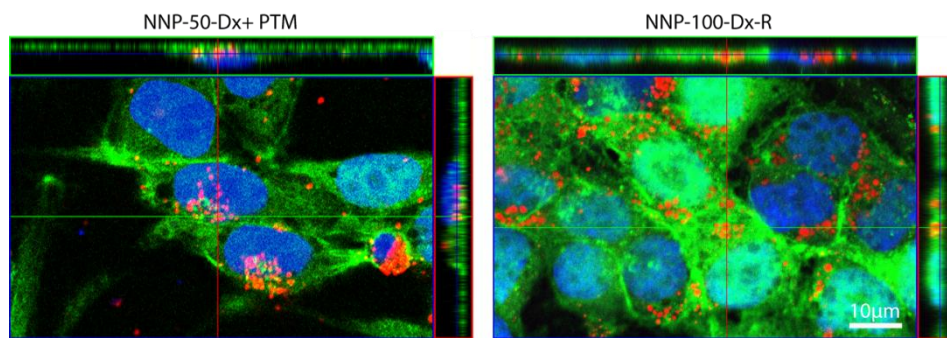


Fig. 30. Imágenes de microscopía confocal mostrando las NNP en el interior de las células hVM1 high Bcl-X_L. Células hVM1 high Bcl-X_L marcadas durante 48h (50µgFe/ml) con NNP-50-Dx+PTM o NNP-100-Dx-R y diferenciadas 4d fueron fijadas y teñidas con un anticuerpo contra dextrano, con faloidina Alexa488 (para marcar los microfilamentos de actina y ayudar a identificar el contorno celular) y TopRo3 para teñir los núcleos. Las preparaciones se analizaron mediante microscopía confocal para determinar la localización celular de las NNP. Mediante proyecciones ortogonales se demostró cómo las NNP se encuentran en el citoplasma celular. El marcaje en rojo de las NNP se observa entremezclado y rodeado del de faloidina (verde) que marca el citosol y en el mismo plano del núcleo (azul) cuando nos centramos en una misma sección de microscopía confocal.

Una vez establecida la localización citoplasmática de las NNP proseguimos a comprobar si éstas se encontraban dentro de endosomas, ya que varios grupos (Neri et al., 2008) relacionan su entrada en la célula a procesos de endocitosis mediada por internalización en endosomas. En este caso células hVM1 high Bcl-X_L+NNP-100-Dx-R diferenciadas 7d fueron fijadas y teñidas con un anticuerpo contra EEA1 (marcador de endosomas tempranos), contra monoxidasa (marcador del aparato de Golgi) o contra CD63 (marcador de los lisosomas) y TopRo3 y analizadas mediante microscopía confocal. Como se puede ver en la figura 31, las NNP (rojo) se encuentran en el citoplasma celular pero no están incluidas dentro de los endosomas, ni de los lisosomas (verde) ni afectan a otras estructuras de membrana como el aparato de Golgi. Las NNP se encuentran preferentemente rodeando el núcleo celular y presentan un alto grado de agregación, formando estructuras de tamaño mayor a los 100nm.

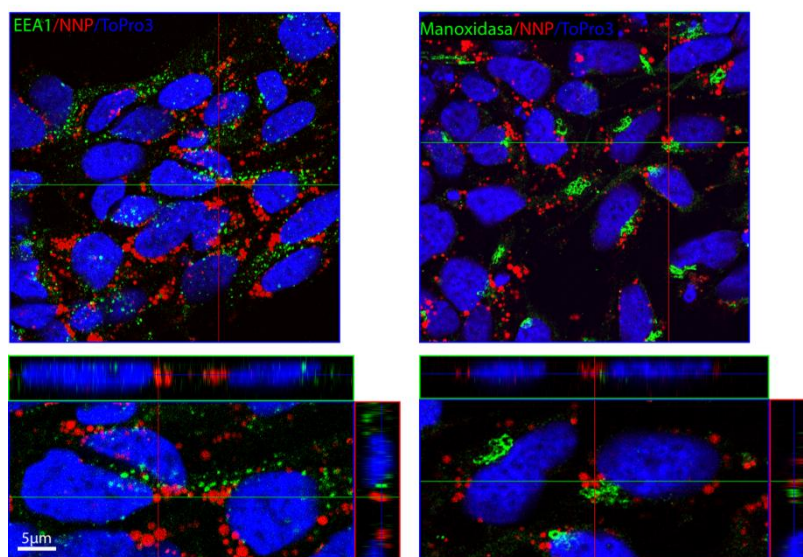


Fig. 31. Localización citoplasmática de las NNP internalizadas.

Células hVM1 high Bcl-X_L+NNP-100-Dx-R diferenciadas 7d fueron fijadas y teñidas con un anticuerpo contra EEA1 (marcador de endosomas tempranos) o contra monoxidasa (marcador del aparato de Golgi) y TopRo3 y analizadas mediante microscopía confocal. Mediante secciones ortogonales podemos ver cómo las NNP (rojo) se encuentran en el citoplasma celular pero no están incluidas dentro de los endosomas (verde), ni afectan a otras estructuras de membrana como el aparato de Golgi. Las NNP se encuentran preferentemente rodeando el núcleo celular y presentan un alto grado de agregación, formando estructuras de tamaño mayor a los 100nm. Podrían estar incluidas en otro tipo de vesículas no analizadas hasta ahora.

III. Persistencia del marcaje con NNP de las células hVM1 high Bcl-X_L con los pases.

Con objeto de predecir si el marcaje puede persistir durante la generación de progenitores *in vivo*, se testó la permanencia del marcaje con NNP a lo largo de los pases de las células en cultivo. Para ello, células hVM1 high Bcl-X_L incubadas con NNP (50-Dx+PTM y 100-Dx-R) durante 48h fueron llevadas hasta pase 3, analizando en cada punto el porcentaje de células marcadas. Como se muestra en la figura 32, el marcaje inicial a pase 0 es superior al 90% del total de células. En pase 1 observamos diferencias significativas en la disminución del marcaje entre células que fueron incubadas con NNP 50-Dx+PTM (88,14±1,65) y las marcadas con NNP-100-Dx-R (34,5±2,43). Ello puede deberse a la acción de la PTM, cuya interacción electrostática con las NNP haría más resistente el marcaje durante el proceso de tripsinización y siembra de las células, perdiéndose menos NNP durante su transcurso. A partir de pase 2 las diferencias observadas a nivel de tipo de NNP utilizado desaparecen y el marcaje disminuye hasta el 12% del total de células, alcanzándose aproximadamente sólo el 2% en pase 3. La marca disminuye un 64% tras un pase, otro 64% al segundo pase y un 84% al tercer pase, hallando finalmente sólo un 2% de células marcadas. Esto demostraría que ambos tipos de

NNP van progresivamente diluyéndose a lo largo del tiempo y los pases, posiblemente por el procedimiento de levantamiento de las células para su pase (lavado y tripsinización) y la propia proliferación celular. Las NNP pueden perderse en el medio con cada división celular y/o repartirse entre las células hijas. Al disminuir su número en el interior de cada célula, disminuye también la capacidad para que sean detectadas con las técnicas de IRM o microscopía de fluorescencia y confocal disponibles.

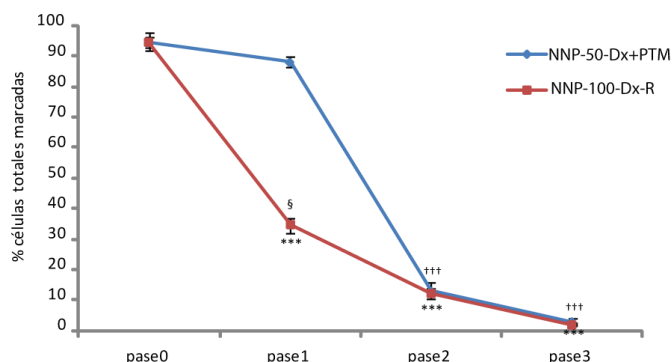


Fig. 32. Pérdida del marcaje con NNP tras varios pases en cultivo.

Células hVM1 high Bcl-X_L incubadas con NNP (50-Dx+PTM y 100-Dx-R) durante 48h fueron llevadas hasta pase 3, analizando en cada punto el porcentaje de células marcadas. El marcaje inicial a pase 0 es superior al 90% del total de células. La marca disminuye un 64% tras un pase, otro 64% al segundo pase y un 84% al tercer pase, hallando finalmente sólo un 2% de células marcadas. Ambos tipos de NNP van progresivamente diluyéndose a lo largo del tiempo. Los datos de la gráfica muestran el porcentaje medio \pm ESM de células marcadas respecto del número total de células del cultivo (n=3). (*p<0,05 **p<0,01; ***p<0,001; ANOVA, Tukey's Kramer test).

* Significativamente diferente de su valor a pase 0 en NNP-100-Dx-R.

+ Significativamente diferente de su valor a pase 0 en NNP-50-Dx+PTM.

§ Significativamente diferente a pase 1 entre NNP-100-Dx-R y NNP-50-Dx+PTM.

IV. Detección mediante IRM de las NNP en el cerebro de roedor.

Una vez establecido el protocolo de marcaje de las células con NNP y la caracterización de su comportamiento "*in vitro*" el siguiente paso fue determinar si las NNP podían ser localizadas mediante técnicas de IRM tras su inyección bilateral en el cerebro de ratas adultas. Para ello 4,5µg/3µl de diferentes tipos de NNP (100-Dx-R, 250-Dx, 50-Dx y 100-Dx) fueron inyectados en el estriado de ratas *Sprague Dawley* de 3 meses de edad, evaluándose la detección de las NNP mediante IRM a los 6 días después del implante. Tras establecer los parámetros óptimos, las imágenes obtenidas tanto coronales (serie rostro-caudal), como sagitales y transversales en T2* de los animales (ver figura 33) muestran como las NNP pueden ser fácilmente identificables apareciendo como una señal hipointensa (oscura en la imagen) en el estriado de estos animales.

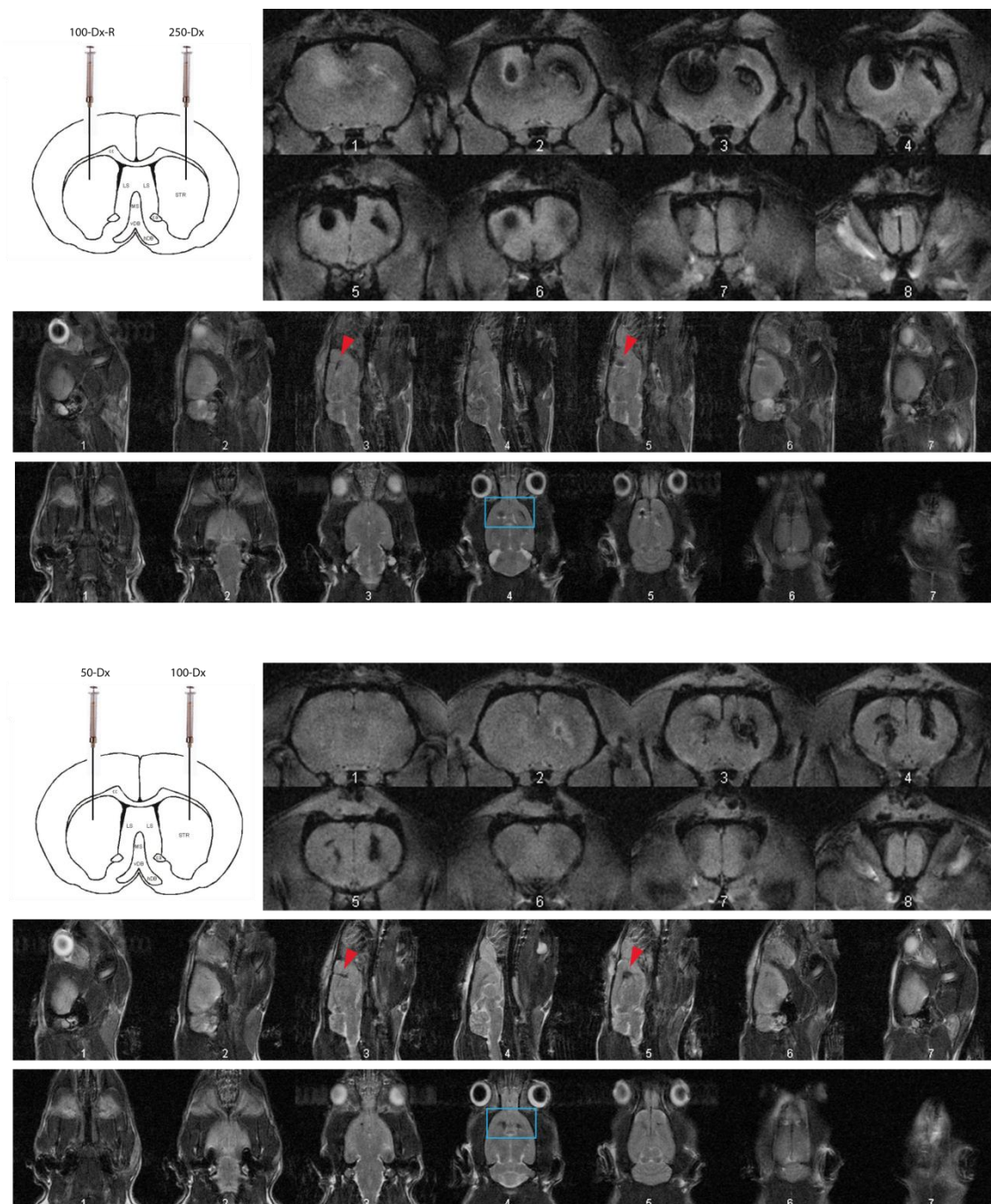


Fig. 33. Detección en el cerebro de roedor de distintos tipos de NNP mediante IRM.

Para ello 4,5µg/3µl de diferentes tipos de NNP (100-Dx-R, 250-Dx, 50-Dx y 100-Dx) fueron inyectados en el estriado de dos ratas *Sprague Dawley* de 3 meses de edad, evaluándose la detección de las NNP mediante IRM (4,7T) a los 6 días después del implante. Las imágenes muestran de manera tanto coronal (serie rostro-caudal, serie superior), como sagital (serie media) y transversal (serie inferior) la región donde se detectan las NNP. Estas pueden ser fácilmente identificables en T2* apareciendo como una señal hipointensa (flecha roja, recuadro azul) en el estriado de estos animales.

Así, concluimos que los 4 tipos de NNP son aptos para ser utilizados como agentes de contraste en IRM, siendo las NNP-100-Dx-R las que producen mayor intensidad en la señal obtenida en IRM. Las variaciones en la intensidad inyectando una misma concentración de

NNP, podría deberse a las diferentes formas de calculo que emplean los fabricantes a la hora de especificar la concentración del producto.

V. **Estudio longitudinal (en el tiempo) mediante IRM del trasplante de células marcadas con NNP.**

Habiendo establecido un protocolo eficiente para el marcaje de las células con NNP y conociendo que es posible la detección de las NNP tras su implante en el cerebro de rata mediante IRM, el siguiente paso fue realizar el trasplante en el estriado de roedor de células marcadas con NNP (según los protocolos puestos a punto en el apartado anterior) y evaluar su seguimiento mediante IRM a lo largo del tiempo. Para ello una rata *Sprague Dawley* de 3 semanas de edad, previamente inmunosuprimida fue trasplantada en el estriado izquierdo con células hVM1 high Bcl-X_L y en el estriado derecho con células hVM1 high Bcl-X_L previamente marcadas con NNP-50-Dx+PTM (48h a 50µg/ml). Se utilizó sólo un animal ya que este experimento se realizó para establecer la prueba de concepto que comprobase la viabilidad de realizar visitas periódicas con los animales al centro de IRM y su posterior estabulación en el animalario del CBM-SO. Tras el trasplante, el animal fue analizado periódicamente mediante IRM durante las 8 semanas posteriores al trasplante. Es importante destacar que el trasplante de células hVM1 high Bcl-X_L sin marcar no provoca ninguna señal en T2* como se observa en el estriado izquierdo de la figura 34. En dicha figura se muestran imágenes coronales representativas del trasplante con las células hVM1 high Bcl-X_L marcadas con NNP en el estriado derecho desde las 48h hasta las 8 semanas post-trasplante. Podemos ver como a las 48h después del trasplante las células marcadas pueden detectarse mediante IRM en el lugar de la inyección como una gran área hipointensa. La señal obtenida en IRM puede ser detectada hasta los 2 meses post-trasplante, disminuyendo ligeramente en intensidad y tamaño el área marcada. Esto puede ser debido a diferentes causas que hacen que se “diluya” la señal, como: la migración de las células trasplantadas hacia distintas zonas del cerebro del roedor (en este caso se observa un pequeño porcentaje de células que han migrado hacia y por el cuerpo calloso, figura 34 imagen 78 y 79), por la expulsión de las NNP del interior de las células trasplantadas y su posterior dispersión en el tejido cerebral o por su captura y eliminación por la microglía reactiva del animal. De estos resultados podemos concluir que el marcaje con NNP de las células trasplantadas y la técnica de IRM son buenas herramientas para determinar si el trasplante ha sido depositado en la región del cerebro correcta del animal y para seguir su evolución y migración de las células (si existe) a lo largo del tiempo utilizando técnicas no invasivas.

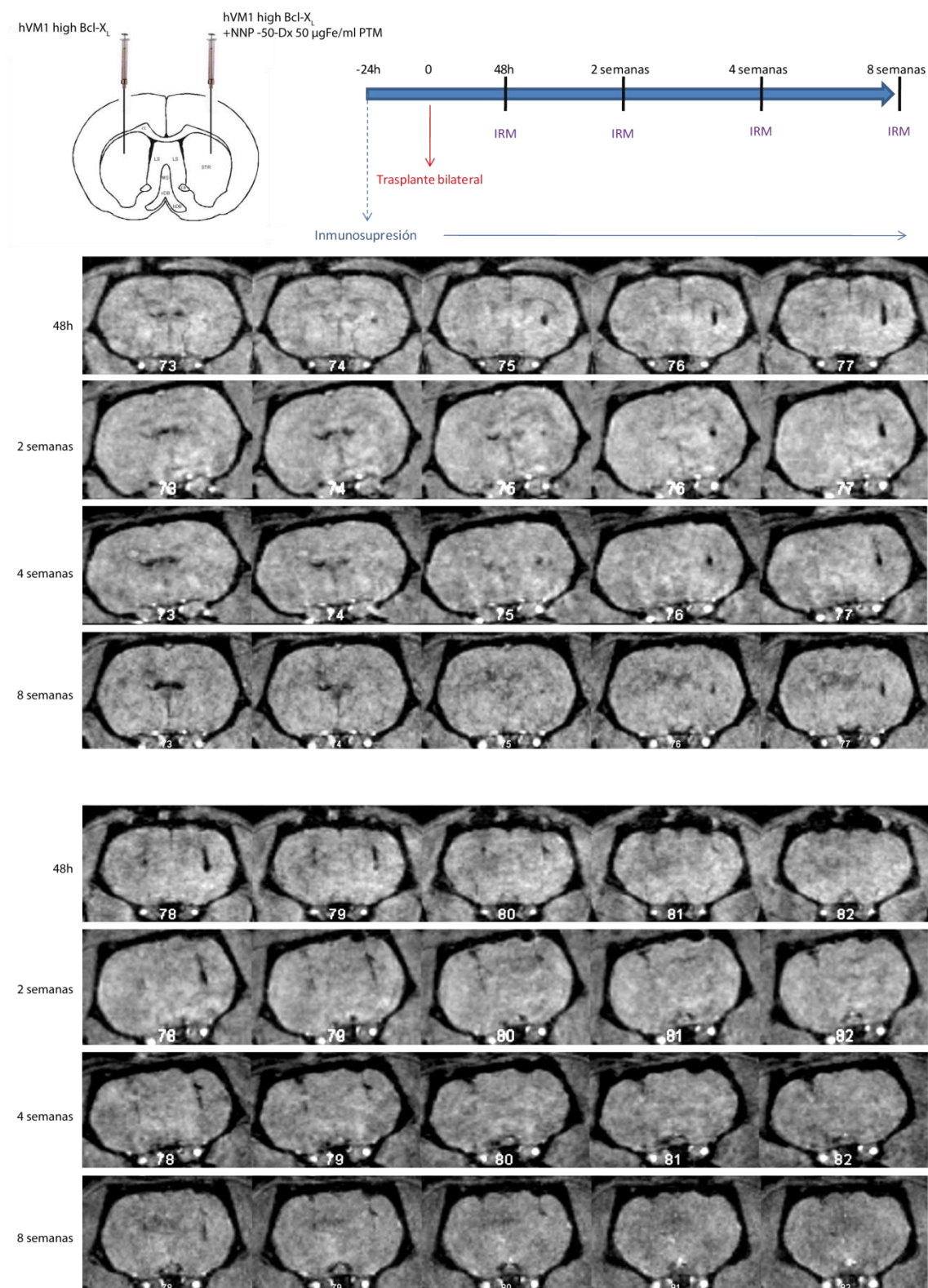


Fig. 34. Estudio longitudinal del trasplante de células hVM1 high Bcl-X_L+NNP en el cerebro de rata mediante IRM. Una rata *Sprague Dawley* de 3 semanas de edad, previamente inmunosuprimida fue trasplantada en el estriado izquierdo con células hVM1 high Bcl-X_L y en el estriado derecho con células hVM1 high Bcl-X_L previamente marcadas con NNP-50-Dx+PTM (48h a 50µg/ml). El animal fue analizado periódicamente mediante IRM desde las 48h hasta las 8 semanas posteriores al trasplante. Como se puede ver en las series coronales del cerebro de la rata, el trasplante de células sin marcar (estriado izquierdo) no provoca ninguna señal en T2*, mientras que trasplante con las células hVM1 high Bcl-X_L marcadas con NNP en el estriado derecho se detecta como una señal hipointensa desde las 48h hasta las 8 semanas post-trasplante.

a) Estudios a corto, medio y largo plazo de los trasplantes marcados con NNP. Análisis mediante histología, IRM y PET.

Tras demostrar la persistencia mediante IRM de la marca con NNP en el tiempo, se llevaron a cabo diversos estudios con ratas trasplantadas con células hVM1 high Bcl-X_L marcadas con NNP para conocer la evolución del trasplante en distintas etapas. Para ello, ratas *Sprague Dawley* hemiparkinsonianas (hemisferio derecho lesionado completamente con 6-OHDA) fueron trasplantadas con células hVM1 high Bcl-X_L + NNP-100-Dx-R (400.000 células) en el estriado derecho. Se realizaron estudios de IRM e histología de la región del trasplante a la semana y los 2 y 5 meses después del implante. Los animales permanecen bajo inmunosupresión desde las 24h anteriores al trasplante hasta el final del estudio.

i) *Estudios a corto plazo.*

En los estudios a 1 semana, como se puede ver en la imagen 35a, la región donde se depositaron las células+NNP puede identificarse perfectamente mediante IRM, localizándose en el estriado derecho del animal y un poco desplazado hacia la corteza. En cortes semifinos del cerebro previamente fijado y utilizando técnicas de inmunofluorescencia la región del trasplante es fácilmente identificable, gracias a que la fluorescencia roja de las NNP-100-Dx-R se mantiene después del proceso de marcaje de las células, el trasplante y la semana post-cirugía. En la figura 35b se observa como las NNP se encuentran distribuidas homogéneamente por todo el trasplante. Mediante inmunohistoquímica y con la tinción contra núcleo humano (hNu) podemos identificar específicamente las células trasplantadas. Así determinamos que un elevado número de ellas presentan un fenotipo muy inmaduro, siendo todavía Nestina positivas. Además, un pequeño porcentaje de las células trasplantadas expresan Ki67, lo que nos indicaría que a una semana post-trasplante aún continúan dividiéndose (figura 35 c y d).

ii) *Estudios a medio plazo.*

Cuando estudiamos trasplantes a medio plazo (2 meses) observamos como la señal obtenida por IRM a 1 semana y 2 meses post-trasplante es muy similar en localización, aunque disminuye ligeramente en intensidad (ver figura 35e). Mediante microscopía de fluorescencia podemos detectar en los cortes de cerebro la zona del trasplante con facilidad (figura 35f) y observamos cómo se van generando acúmulos o agregados de NNP en la periferia del trasplante que no estaban presentes a 1 semana. Tras 2 meses, las células continúan mostrando un fenotipo inmaduro (Nestina positivas) y además encontramos un fenotipo glial (hGFAP positivas, anticuerpo específico de humano) en un elevado número de células (figura 35 g-h).

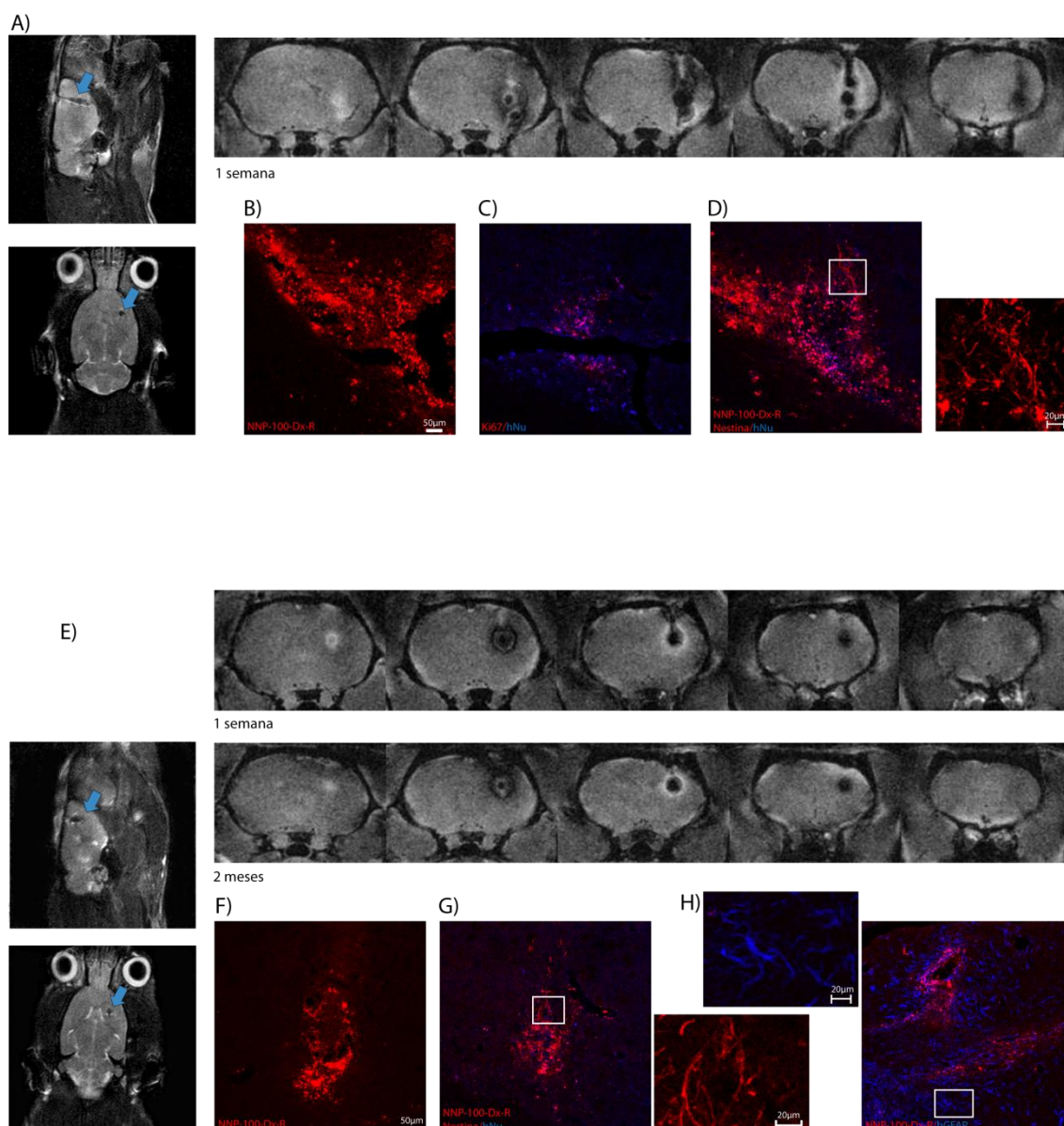


Fig. 35. Seguimiento mediante IRM e IHC de los trasplantes de células hVM1 high Bcl-X_L+NNP en el cerebro de rata a corto y medio plazo.

Para ello, ratas *Sprague Dawley* hemiparkinsonianas (hemisferio derecho lesionado completamente con 6-OHDA) fueron trasplantadas con células hVM1 high Bcl-X_L + NNP-100-Dx-R (400.000 células) en el estriado derecho.

A-D) Estudios a corto plazo: 1 semana post-trasplante. Mediante las imágenes coronales, sagitales y transversales de IRM (flecha azul) podemos ver perfectamente la región donde se localizan las células trasplantadas (A). En cortes semifinos del cerebro previamente fijado y utilizando técnicas de inmunofluorescencia podemos ver mediante microscopía confocal la región del trasplante gracias a la fluorescencia roja de las NNP-100-Dx-R (B) y colocalizar esta región con otros marcadores que nos indiquen la evolución del mismo (C-D). Mediante inmunohistoquímica y con la tinción contra núcleo humano (hNu, azul) podemos identificar específicamente las células trasplantadas, siendo estas Nestina (D) y Ki67 (C) positivas (rojo).

E-H) Estudios a medio plazo: 1 semana y 2 meses post-trasplante. Mediante las imágenes coronales, sagitales y transversales de IRM (flecha azul) podemos ver perfectamente la región donde se localizan las células trasplantadas a 1 semana y 2 meses post-cirugía (E). Mediante microscopía de fluorescencia podemos detectar en los cortes de cerebro la zona del trasplante con facilidad (F) y observamos cómo se van generando acúmulos o agregados de NNP (rojo) en la periferia del trasplante que no estaban presentes a 1 semana. Las células continúan mostrando un fenotipo inmaduro (Nestina, rojo, G) tras 2 meses, y además encontramos células gliales (hGFAP azul, H) en un alto porcentaje.

iii) *Estudios a largo plazo.*IRM

En los estudios a largo plazo se evaluó el marcaje de células hVM1 high Bcl-X_L con NNP a los 2 y 5 meses post-trasplante. Como se puede ver en la figura 36a, aunque la IRM se realizó con metodología distinta (esto fue debido a la posibilidad de colocación de la imagen de IRM y PET obtenidas en el CIMES), no se observan diferencias significativas en la señal obtenida entre los 2 y los 5 meses post-trasplante, destacando la posibilidad de detectar las NNP tras un periodo de tiempo largo. Además, la fluorescencia roja de las NNP se conserva tras 5 meses, pudiendo ser reconocida perfectamente la región del trasplante mediante microscopía de fluorescencia (figura 36b) en las secciones del cerebro de rata. Como se observa en la figura b, en los márgenes del trasplante, tanto por la zona superior como inferior, vemos grandes agregados de NNP que, como se aprecia en el detalle de microscopía confocal, ya no se encuentran en el interior de las células hVM1 high Bcl-X_L. Las células trasplantadas, identificadas además con hNu, siguen teniendo un fenotipo inmaduro y son Nestina y hGFAP positivas (figura 36 c y d). Podemos ver en los detalles de microscopía confocal la co-localización de hNu y Nestina, y cómo hay células tanto Nestina como hGFAP positivas que aún retienen NNP en su interior. En el estriado trasplantado y sobre todo en los márgenes del trasplante encontramos una gran cantidad de microglía reactiva de la propia rata (células OX42 positivas). Estas células llevan en su interior un elevado número de NNP, por lo que podríamos concluir que tras 5 meses las células trasplantadas pierden parte de las NNP, que pasan a formar acúmulos en el borde del trasplante o son incorporadas por la microglía reactiva de la rata. Por tanto, la señal obtenida mediante IRM a largos periodos de tiempo post-trasplante, muestra las células trasplantadas pero también las NNP que se encuentran entre ellas y las que han sido incorporadas por la microglía.

Tras 5 meses, sólo unas pocas células cercanas a la zona de inyección del trasplante continúan siendo Ki67 positivas. Otros marcadores que indiquen un mayor grado de maduración del trasplante, como DCX o β -III-Tubulina han sido encontrados en un número muy bajo de células. No se han hallado células trasplantadas TH positivas como en otros estudios previos realizados en el laboratorio (Courtois et al., 2010). No se ha podido determinar si las NNP influyen en la diferenciación de los trasplantes, ya que aquellos realizados con células sin marcar tampoco alcanzaron el grado de diferenciación observado en estudios anteriores.

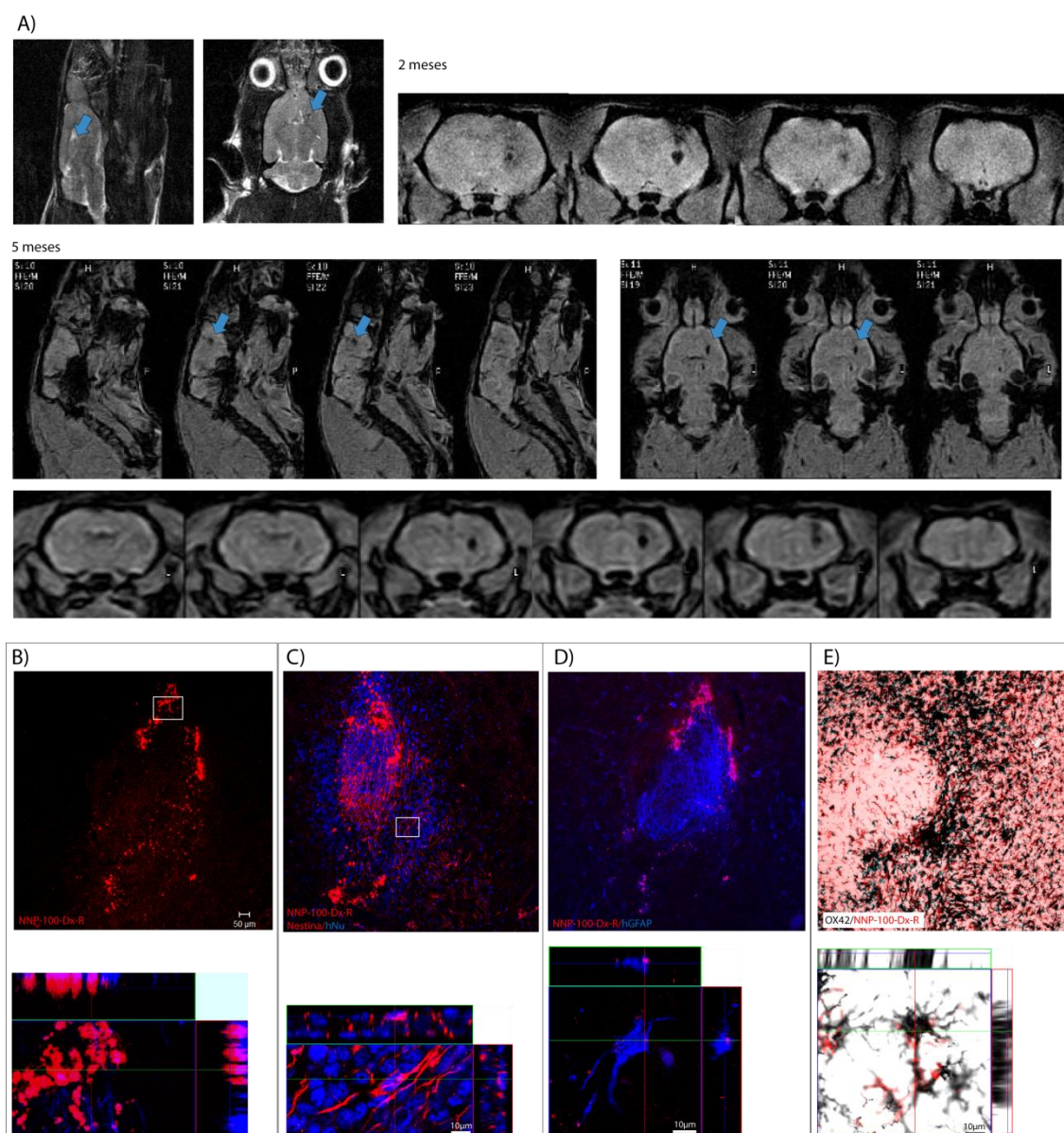


Fig. 36. Seguimiento mediante IRM e IHC de los trasplantes de células hVM1 high Bcl-X_L+NNP en el cerebro de rata a largo plazo (5 meses post-trasplante).

A) La IRM a 5 meses se realizó con un resonador de 7T para humanos localizado en el CIMES, no encontrando diferencias significativas a nivel de detección de las NNP con el utilizado previamente (2 meses) en el CAI de 4,7T. Como se muestra en la imagen, las NNP pueden ser detectadas (flecha azul) desde los 2 hasta los 5 meses en el estriado de la rata, tanto en secciones coronales, sagitales y transversales del cerebro del animal.

B) Mediante microscopía de fluorescencia se puede reconocer perfectamente la región del trasplante, ya que las NNP conservan su fluorescencia roja después de 5 meses.

C-E) Inmunohistoquímica de las secciones del cerebro de rata 5 meses después del trasplante. Las células trasplantadas, identificadas además del marcaje en rojo de las NNP con hNu (azul), siguen teniendo un fenotipo inmaduro y son Nestina y hGFAP positivas (c y d). Podemos ver en los detalles de microscopía confocal la co-localización de hNu y Nestina, y cómo hay células tanto Nestina como hGFAP positivas que aún retienen NNP en su interior. E) Mediante inmunohistoquímica revelada con DAB podemos ver como en el estriado trasplantado, y sobre todo en los márgenes del trasplante, encontramos una gran cantidad de microglía reactiva de la propia rata (células OX42 positivas). Estas células tienen una gran cantidad de NNP en su interior.

PET

Los estudios de PET incluyeron una rata hemiparkinsoniana (no trasplantada), utilizada como control que nos ayudase a evaluar cómo era la imagen de PET utilizando ^{11}C -DHTBZ en un hemisferio bien lesionado (testado mediante test de comportamiento) frente a la del estriado intacto, y varias ratas trasplantadas con células hVM1 high Bcl-X_L y hVM1 high Bcl-X_L + NNP-100-Dx-R para testar si las NNP influían de alguna manera en la unión de la sonda o la captura de imágenes. A continuación se detallarán los resultados obtenidos para la rata control y la rata trasplantada con células hVM1 high Bcl-X_L + NNP-100-Dx-R cuya IRM e histología fue descrita en el apartado anterior.

A) Rata control lesionada con 6-OH

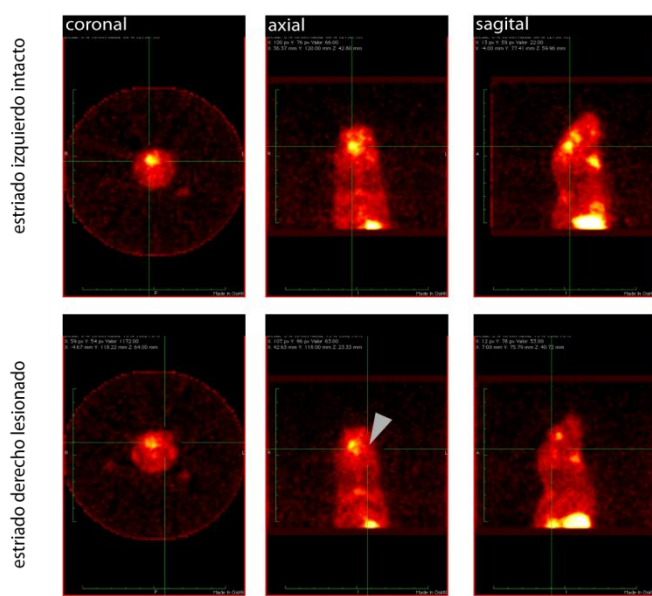
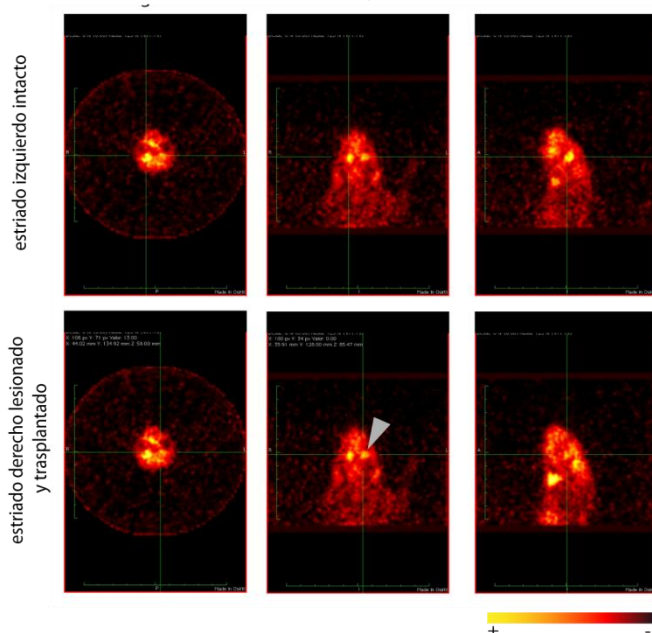
B) Rata hemiparkinsoniana trasplantada con células hVM1 high Bcl-X_L+NNP-100-Dx-R a los 5 meses del trasplante.

Fig. 37. Estudio de la funcionalidad de VMAT2 en los trasplantes de células hVM1 high Bcl-X_L+NNP en el cerebro de rata a largo plazo (5 meses post-trasplante) mediante PET.

Este estudio de PET incluye una rata hemiparkinsoniana (no trasplantada), utilizada como control para evaluar la imagen de PET utilizando ^{11}C -DHTBZ en un hemisferio bien lesionado frente a la del estriado intacto, y una rata trasplantada con células hVM1 high Bcl-X_L + NNP-100-Dx-R.

A) Imágenes de PET mostrando secciones coronales, axiales y sagitales del estriado intacto y lesionado de la rata control tras la administración del ^{11}C -DHTBZ. La flecha gris señala la región del estriado derecho lesionado sin señal porque el ^{11}C -DHTBZ no se ha unido a los terminales dopaminérgicos. B) Imágenes de PET mostrando secciones coronales, axiales y sagitales del estriado intacto y lesionado de la rata trasplantada con células hVM1 high Bcl-X_L+NNP hace 5 meses. Tras la administración del ^{11}C -DHTBZ se observa algo de señal (flecha gris) en la zona del estriado donde se localizaría el trasplante.

Como se puede ver en la figura 37 a, la rata control, tras la administración intraperitoneal del ^{11}C -DHTBZ y el correspondiente tiempo de lavado y adquisición de imágenes, muestra una intensa señal en el estriado izquierdo que no aparece en el hemisferio derecho lesionado. Esto indica que una inyección de 3,6mCi/200 μl de sonda, con los parámetros de adquisición de imágenes cada 2, 4, 8 y 12 min, son adecuados para una correcta visualización del ^{11}C -DHTBZ que es incorporado mediante VMAT2 a los terminales de las neuronas dopaminérgicas que se encuentran en el estriado. Además, corrobora los datos de obtenidos en los test de comportamiento, determinando que nuestros protocolos permiten seleccionar correctamente las ratas bien lesionadas y nos indica una buena metodología de lesión por 6-OHDA, ya que no se aprecia marca en el estriado derecho lesionado.

Al analizar los resultaos de la rata lesionada y trasplantada con células hVM1 high Bcl-X_L + NNP-100-Dx-R observamos algo de señal en el estriado derecho lesionado y trasplantado (ver figura 37b). Después de los buenos resultados obtenidos en el PET con la rata control y sabiendo que el trasplante de esta rata tras 5 meses presentaba células con fenotipo muy inmaduro (no hay células TH positivas), no podemos decir que la señal detectada sea debida a la presencia de neuronas dopaminérgicas funcionales. Dicha señal es similar a la obtenida en otras ratas analizadas mediante PET que fueron trasplantadas con células sin NNP, por lo que la señal observada no es un artefacto o interferencia entre la técnica de PET con ^{11}C -DHTBZ y el marcaje con NNP. Dado que esta rata no pudo ser analizada mediante PET antes del trasplante para evaluar el grado de la lesión con 6-OHDA al igual que la rata control, la señal podría deberse a restos de neuronas o fibras dopaminérgicas en el estriado derecho, el cual no presentaría una lesión total. La señal también puede ser debida a un efecto del trasplante sobre el tejido del estriado. Puede que la cirugía y el depósito de células dañasen la microvasculatura de la zona, haciendo que el lavado de la sonda en esta área sea más lento o incompleto y esto produzca la señal que observamos en PET. También podría deberse a una captura inespecífica de la sonda por las células de fenotipo inmaduro del trasplante o por la microglía reactiva de la rata que se encuentra activa en la región del trasplante.

Hasta el momento hay pocos estudios relacionados con PET para ^{11}C -DHTBZ (Collantes et al., 2008), por lo que serán necesarios experimentos futuros para completar estos resultados y aclarar si esta metodología es apta para el seguimiento *in vivo* de la evolución y funcionalidad de un trasplante en el estriado de ratas hemiparkinsonianas.

3. EFECTOS DE LA SOBRE-EXPRESIÓN DE BCL-X_L EN CÉLULAS HUMANAS DERIVADAS DE MESENCÉFALO VENTRAL: ANÁLISIS DE MICROARRAYS DE ADN.

I. Diseño del estudio.

Estudios anteriores realizados en el laboratorio demostraron que el mantenimiento de la línea celular hVM1 durante largo periodo en cultivo hasta alcanzar un elevado número de pase (más de pase 30 o un año en cultivo) provocaba una drástica reducción en su potencial para generar neuronas y concretamente neuronas dopaminérgicas (menor del 1% del total de células) (Courtois et al., 2010) Este fenómeno había sido anteriormente descrito para cultivos de neuroesferas también derivadas de mesencéfalo ventral. Basándose en estudios previos realizados con células humanas de origen fetal y derivadas de cerebro anterior en las cuales la expresión forzada de Bcl-X_L se asoció con un incremento en el número de progenitores neuronales frente a gliales y específicamente una inducción de neuronas dopaminérgicas generadas *in vitro* (Liste et al., 2007), se testó la eficiencia de la expresión forzada de Bcl-X_L en esta línea derivada de mesencéfalo ventral. Los resultados mostraron cómo Bcl-X_L era capaz de recuperar y/o mantener (sobre-expresión a pase alto o bajo y mantenimiento en cultivo) la generación de neuronas y células TH positivas cuando las células se mantenían largos periodos en cultivo (Tesis Dr. Elise Courtois, 2008) (Courtois et al., 2010) Tras la introducción de Bcl-X_L el porcentaje de neuronas era de un 25% (β -III-Tubulina positivas) y concretamente de neuronas dopaminérgicas (TH positivas) alcanzaba el 17% (ver resultados previos en la sección 6 de la Introducción).

Con la idea de comprender qué está ocurriendo en las células hVM1 con los pases y el efecto que tiene la expresión forzada de Bcl-X_L en ellas, nos planteamos realizar un análisis masivo de expresión génica mediante *microarrays* de ADN. Con ello pretendíamos obtener información acerca de:

- qué genes cambian en su expresión con los pases en hVM1;
- qué genes cambian con los pases al sobre-expresar Bcl-X_L en hVM1;
- qué genes cambian al introducir Bcl-X_L en pases bajos/altos respecto a hVM1;
- de lo que cambia con los pases en hVM1, qué es distinto con Bcl-X_L;
- de lo que cambia con Bcl-X_L a pase bajo qué se mantiene cambiado a pase alto.

Se llevó a cabo un experimento de *microarrays* de ADN utilizando el sistema de Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 en el que se compararon células hVM1 y hVM1 high

Bcl-X_L de pase bajo (10 y 15 respectivamente) y alto (35) a día 4 de diferenciación (día clave de la diferenciación en el que comienzan a expresarse genes proneuronales (resultados previos obtenidos en el laboratorio (sección 6 de la Introducción) y (Seo et al., 2007)). Estábamos interesados en descubrir qué genes se ven afectados con los pases en la línea hVM1 resultando en la pérdida su capacidad neurogénica tras largo tiempo en cultivo y aquellos genes en los que la sobre-expresión de Bcl-X_L está ejerciendo algún efecto recuperando/manteniendo la capacidad de generar neuronas aún a pases elevados, y concretamente incrementando el número de neuronas dopaminérgicas. Para ello se realizaron las siguientes comparaciones:

- hVM1 pase10 (hVM10) vs hVM1 pase35 (hVM35)
- hVM1 high Bcl-X_L pase35 (HB35) vs hVM1 high Bcl-X_L pase15 (HB15)
- hVM1 high Bcl-X_L pase35 (HB35) vs hVM10
- además se agruparon aquellas muestras con una capacidad dopaminérgica similar (hVM10, HB15 y HB35) y se compararon frente a las que la han perdido (hVM35).

II. Determinación de los parámetros estadísticos del análisis

En total fueron analizadas 3 réplicas biológicas de cada tipo celular. Utilizando el método de correlación de *Pearson* se establecieron los valores de correlación entre parejas de hibridaciones de las réplicas biológicas, demostrando la reproducibilidad y fiabilidad de las mismas (valores >0,9, figura 38).

pearson	hVM 10.1	hVM 10.2	hVM 10.3	hVM 35.1	hVM 35.2	hVM 35.3	HB 15.1	HB 15.2	HB 15.3	HB 35.1	HB 35.2	HB 35.3
hVM 10.1	1.000	0.991	0.986	0.980	0.982	0.980	0.984	0.962	0.984	0.976	0.975	0.976
hVM 10.2	0.991	1.000	0.985	0.980	0.981	0.980	0.983	0.958	0.984	0.975	0.977	0.974
hVM10.3	0.986	0.985	1.000	0.983	0.985	0.984	0.992	0.969	0.991	0.983	0.983	0.982
hVM 35.1	0.980	0.980	0.983	1.000	0.994	0.994	0.984	0.959	0.986	0.983	0.982	0.982
hVM 35.2	0.982	0.981	0.985	0.994	1.000	0.996	0.986	0.964	0.987	0.984	0.984	0.985
hVM 35.3	0.980	0.980	0.984	0.994	0.996	1.000	0.988	0.959	0.988	0.984	0.985	0.985
HB 15.1	0.984	0.983	0.992	0.984	0.986	0.988	1.000	0.970	0.995	0.985	0.985	0.987
HB 15.2	0.962	0.958	0.969	0.959	0.964	0.959	0.970	1.000	0.968	0.962	0.956	0.965
HB 15.3	0.984	0.984	0.991	0.986	0.987	0.988	0.995	0.968	1.000	0.984	0.986	0.986
HB 35.1	0.976	0.975	0.983	0.983	0.984	0.984	0.985	0.962	0.984	1.000	0.995	0.995
HB 35.2	0.975	0.977	0.983	0.982	0.984	0.985	0.985	0.956	0.986	0.995	1.000	0.994
HB 35.3	0.976	0.974	0.982	0.982	0.985	0.985	0.987	0.965	0.986	0.995	0.994	1.000

Fig. 38. Análisis de correlación entre muestras.

Valores de correlación entre parejas de hibridaciones. En verde se muestran parejas de réplicas con $R^2 > 0.99$ y en amarillo las parejas de réplicas con $R^2 < 0.99$. En blanco aparecen las parejas no correspondientes a réplicas.

Una vez normalizados los datos por RMA (algoritmos robustos para el análisis de *microarrays*) los valores de p calculados por el método de LIMMA fueron ajustados mediante FDR basándose en método de Benjamini-Hochberg (Reiner et al., 2003). Posteriormente, se determinó que de las múltiples combinaciones posibles para los umbrales de *fold change* y FDR, la más relevante a la hora de seleccionar un número de genes manejable con una expresión diferencial y que no fuese demasiado restrictiva correspondía a un *fold change* de $\pm 1,8$ y FDR = 0,01 para las distintas comparaciones (ver figura 39).

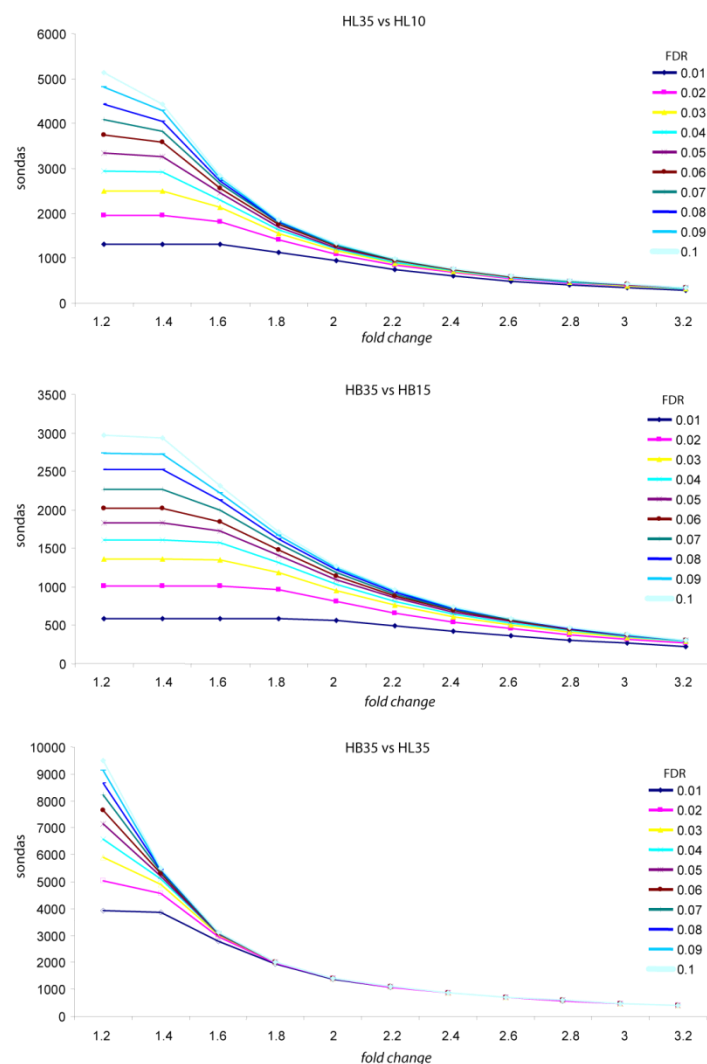


Fig. 39. Selección de umbrales para los parámetros de análisis del *microarray*.

Resultados más relevantes en cada comparación de líneas celulares para varias combinaciones de umbrales basados en *fold change* (FC) y FDR. Umbrales propuestos: FC $\geq 1,8$ y FDR $\leq 0,01$.

Introduciendo los datos obtenidos del análisis de Affymetrix del *microarray* en la aplicación online FIESTA viewer v1.0. (<http://bioinfoGP.cnb.csic.es/tools/FIESTA/index.php>, BioinfoGP, CNB) y seleccionando los valores de *fold change* y FDR arriba mencionados, podemos descartar los genes que se encuentran fuera de estos parámetros de análisis y obtener tanto un diagrama

de dispersión de los genes diferencialmente expresados para cada comparación como la lista filtrada de ellos.

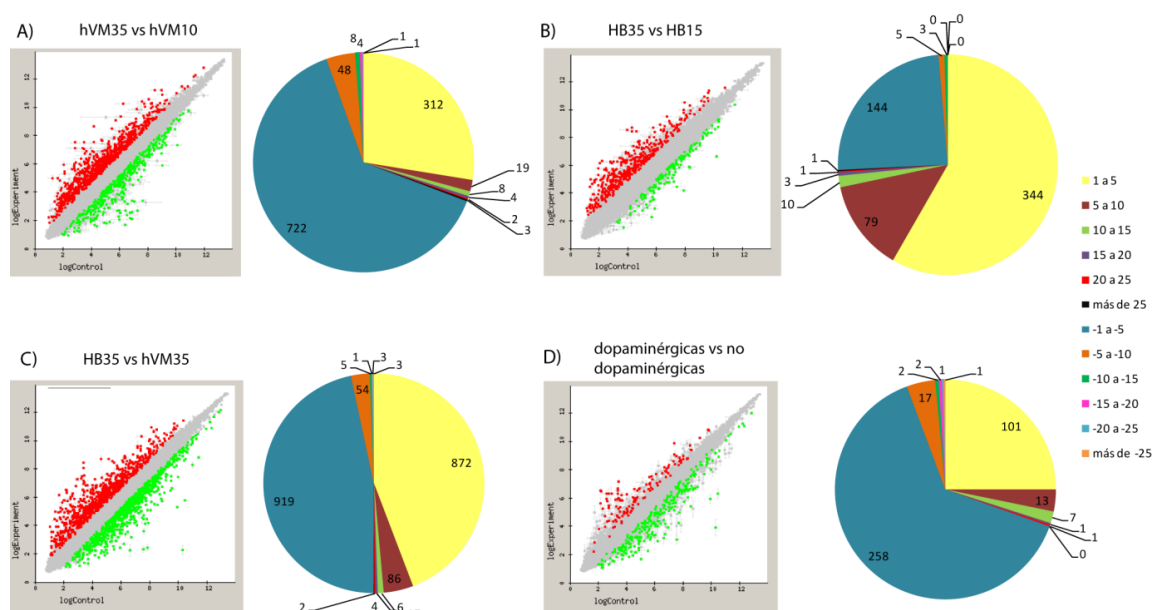


Fig. 40. Representación esquemática de los genes que cambian en el *microarray* para cada comparación de muestras.

Podemos ver la representación obtenida con el programa FIESTA viewer 1.0 de la distribución de los genes como una nube de puntos. En ella observamos en rojo los genes inducidos, en verde los genes reprimidos y en gris estarían aquellos cuyo índice de cambio no supera el umbral establecido. También podemos ver en forma de diagrama de tarta, el número de genes que se encuentran dentro de un índice de cambio de 1-5, 5-10, 10-15, 15-20, 20-25 o mayor de 25 veces de aumento o represión respecto de la muestra comparada.

Como se observa en la figura 40, en los diagramas de dispersión para las cuatro comparaciones la nube principal de puntos que corresponde a los genes estudiados en el *microarray* se ajusta a una recta, mostrando por encima o por debajo de ella aquellos genes cuya expresión se ve significativamente alterada en una condición frente a otra. De esta forma se obtuvo la siguiente distribución de genes:

	Inducidos	Reprimidos	Total
hVM35 vs hVM10	348	784	1132
HB35 vs HB15	438	152	590
HB35 vs hVM35	987	985	1972
dopaminérgicas (hVM10, HB15, HB35) vs no dopaminérgicas (hVM35)	88	202	404

Tabla 4. Resumen de la distribución de genes inducidos y reprimidos tras el primer análisis de los resultados del *microarray* de ADN.

Utilizando estos criterios identificamos el índice de cambio para cuatro genes (S100 β , GFAP, DCX y TH) que nos sirven como control interno del experimento, ya que sus cambios se ajustan a lo esperado en base a conocimientos previos.

III. Cambios en genes con función conocida en el desarrollo y generación de neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo ventral.

La primera y obvia hipótesis que explicaría la reducción en la generación de neuronas dopaminérgicas con los pases en células hVM1 sería que las células sufriesen cambios que hiciesen perder su carácter de NSC, de progenitores neuronales o su regionalización. Para evaluar esta posibilidad se examinaron todos los genes estudiados en la primera sección de resultados y otros con una función clara y conocida en desarrollo y neurogénesis dopaminérgica.

GEN	hVM35 vs hVM10	HB35 vs hVM35
DAT	-	-
DCX	-	-
EN1	-	-
EN2	2,41	-2,91
FGF8	-	-
L1CAM	2,54	-
LMX1A	-	-
LMX1B	-	-
MASH1	-	-
MSX1	3,68	-
NESTINA	-	-1,84
NETRINA1	2,24	-4,54
NEUROGENINA2	-	-
NKX 2.2	-	-
NKX 6.1	-	-
NURR1	-	-
OTX2	-	2,18
PITX3	-	-
RALDH1	-	-
RET	-	-
RXRA	2,19	-
SHH	-	-
SOX2	-	-
TGFB1	3,12	-
TGFBR2	5,51	-
TGFBR3	-	2,22
TH	-	5,5
VMAT2	-	-
VIMENTINA	-	-3,25
WNT1	-	-
WNT5A	2,14	-

Tabla 5. Índice de cambio de los genes relacionados con el fenotipo dopaminérgico mesencefálico según los parámetros de *fold change* y FDR elegidos.

Al examinar los valores de cambio para las comparaciones hVM35vshVM10 y HB35vshVM35 comprobamos que a 4d de diferenciación casi ningún gen implicado en especificación mesencefálica y adquisición del fenotipo dopaminérgico se ve alterado con los pases en la línea hVM1 o a pase alto tras la expresión forzada de Bcl-X_L (ver tabla 5). Los ligeros cambios que se observan en algunos genes con los pases (por ejemplo *MSX1*, *TGFBR2*, *WNT5a*, *EN2*...) son al alza, lo cual favorecería neurogénesis y no lo contrario. Por tanto es necesario plantear otro tipo de hipótesis, consistente en que la disminución en el número de neuronas, y de neuronas dopaminérgicas concretamente visto en la línea hVM1 con los pases en cultivo, ha de ser debida a la alteración de genes relacionados con neurogénesis en general, o bien de otros genes que hasta ahora no han sido asociados directamente con el desarrollo del fenotipo dopaminérgico. Bcl-X_L podría estar actuando directa o indirectamente sobre ellos preservando/aumentando el número de progenitores neuronales en los cultivos de una manera desconocida por el momento.

IV. Selección de genes candidatos a jugar un papel importante en la generación de neuronas dopaminérgicas desde hNSC de mesencéfalo ventral.

Según los criterios estadísticos anteriores, podemos agrupar la lista genes obtenidos según su índice de cambio en distintas categorías: de 1 a 5, de 5 a 10, de 10 a 15, de 15 a 20, de 20 a 25 o mayor de 25 veces de aumento o represión respecto de la muestra comparada. Esto nos permite comprobar de manera más intuitiva que la mayoría de genes se encuentran en unos valores de cambio bajos (de 1 a 5 veces, ver figura 40).

Al prescindir de estos genes con valores tan bajos y mediante un análisis exhaustivo, tanto manual (basado en conocimientos previos y bibliográficos sobre células madre embrionarias, células troncales neurales, neurogénesis, enfermedad de Parkinson y el sistema dopaminérgico nigroestriatal) como mediante herramientas informáticas (DAVID, Functional Annotation Tool DAVID Bioinformatics Resources 2008, NIAID/NIH que permite asociar genes a procesos biológicos, celulares, moleculares o rutas proteicas concretas), podemos limitar la lista de genes de interés a unos 62 candidatos, y ver que procesos biológicos/celulares están mayoritariamente afectados en cada comparación. De forma general, y tras tomar un p-value de E^{-03} como significativo en los resultados obtenidos con DAVID (ver tabla 6), podemos decir que:

- entre las muestras agrupadas como dopaminérgicas y la no dopaminérgica varían genes asociados al desarrollo del sistema nervioso y de estructuras anatómicas y procesos celulares de desarrollo y diferenciación celular;
- con los pases en hVM1 se ven afectados mayoritariamente genes implicados en desarrollo del sistema nervioso, diferenciación de neuronas, la vía de Notch, migración neuronal y formación del eje anterior-posterior;
- a pase alto la expresión forzada de Bcl-X_L afecta a los procesos de desarrollo del sistema nervioso y de las estructuras anatómicas, la diferenciación celular, la adhesión celular, neurogénesis y migración, las uniones de iones de calcio, la proliferación celular y la cascada de MAPKKK.

dopaminérgicas vs no dopaminérgicas			HB35vshVM35		
Término	P-Value	%	Término	P-Value	%
desarrollo del sistema nervioso	8.93E-07	28.21%	procesos de desarrollo	1.74E-08	32.88%
desarrollo de estructuras anatómicas	1.06E-05	38.46%	desarrollo del sistema nervioso	3.32E-08	15.07%
desarrollo de sistemas	3.93E-05	33.33%	desarrollo de estructuras anatómicas	5.24E-08	25.34%
procesos de desarrollo	2.82E-04	41.03%	diferenciación celular	1.70E-06	21.23%
procesos de desarrollo celular	1.35E-03	28.21%	procesos de desarrollo celular	1.70E-06	21.23%
diferenciación celular	1.35E-03	28.21%	unión de proteínas	9.24E-05	41.78%
			adhesión celular	1.74E-04	10.96%
hVM35vshVML10			neurogénesis	2.30E-04	6.85%
Término	P-Value	%	migración neuronal	2.85E-04	3.42%
desarrollo del sistema nervioso	8.26E-13	40.54%	migración celular	4.44E-04	6.16%
desarrollo de estructuras anatómicas	5.07E-09	45.95%	desarrollo de órganos	7.03E-04	13.70%
diferenciación celular	7.02E-08	40.54%	unión de iones de calcio	1.42E-03	10.27%
procesos de desarrollo	2.57E-07	48.65%	proyecciones celulares	2.18E-03	6.16%
uniones de Notch	6.86E-05	8.11%	proliferación celular	2.31E-03	9.59%
generación de neuronas	7.22E-05	16.22%	morfogénesis de estructuras anatómicas	3.16E-03	11.64%
compromisos de destino celular	3.49E-04	10.81%	cascada MAPKKK	4.61E-03	4.11%
proyecciones celulares	2.00E-03	13.51%	diferenciación de neuronas	6.43E-03	4.79%
migración neuronal	2.53E-03	8.11%	movilidad celular	6.94E-03	6.16%
vía de señalización de Notch	2.85E-03	8.11%	localización celular	6.94E-03	6.16%
formación del eje anterior-posterior	5.15E-03	8.11%	partes de membrana	7.01E-03	36.99%
diferenciación de neuronas	6.70E-03	10.81%	espacio extracelular	7.68E-03	6.85%
especificación de compartimentos	9.34E-03	5.41%	desarrollo celular	7.80E-03	11.64%

Tabla 6. Procesos biológicos afectados mayoritariamente en cada comparación celular.

La tabla muestra el resultado de DAVID tras analizar los 62 genes candidatos (prescindiendo de aquellos con un índice de cambio bajo), exponiendo las funciones biológicas en las que se pueden clasificar estos genes según Gene Ontology, que aparecen mayoritariamente afectadas ($p\text{-value} > E^{-03}$) en cada caso.

Al sobre-exresar Bcl-X_L se ven afectados genes implicados en procesos de unión de proteínas, desarrollo del sistema nervioso, diferenciación celular, adhesión, neurogénesis, comunicación celular y transcripción.

Antes de comenzar con la validación de los resultados obtenidos en los *microarrays*, se intentaron reducir los 62 genes candidatos sometiéndolos a un nuevo tipo de análisis, en base a los datos crudos de intensidad normalizada de fluorescencia para cada muestra celular. Éste es un análisis clásico, manual, que en cierta forma obvia el procesamiento bioinformático anterior, pero que permite en un número reducido de genes detectar patrones de cambio y confirmar la validez estadística de estos patrones. Teniendo en cuenta los valores para cada sonda incluidos en cada *microarray* (hay varias copias de la sonda de un mismo gen en cada chip), se calculó la media por chip y finalmente la media de los tres chips para cada gen de interés. De esta forma se pudieron establecer distintos patrones de expresión que permiten agrupar los genes según aumente o disminuya significativamente su valor en las hVM35 respecto de las otras líneas celulares o no (ver tabla 7).

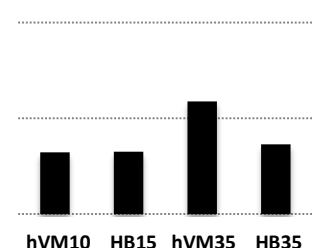
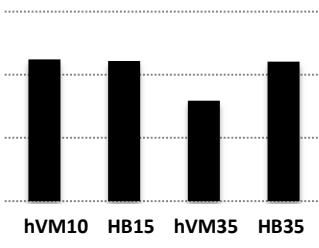
Patrón de expresión según el log normalizado de las intensidades	Genes
 <p>hVM10 HB15 hVM35 HB35</p>	<p>Aumentan con los pases en hVM35 y no hay diferencias entre Bcl-X_L y hVM10. Aumentan con los pases en hVM35 pero menos con Bcl-X_L o que HB35 presenta diferencias significativas con hVM10.</p> <p>6 genes</p>
 <p>hVM10 HB15 hVM35 HB35</p>	<p>Disminuyen con los pases en hVM35 y no hay diferencias entre Bcl-X_L y hVM10. Disminuyen con los pases en hVM35 pero menos con Bcl-X_L o que HB35 presenta diferencias significativas con HL10.</p> <p>21 genes</p>
Genes que no se ajustan a un patrón.	9 genes

Tabla 7. Distribución de los genes según su patrón de expresión teniendo en cuenta el logaritmo normalizado de las intensidades del *microarray*.

Los 62 genes candidatos fueron sometidos a un análisis basado en el log. normalizado de la intensidad que presentaban en los datos crudos del *microarray*. De esta forma se descartaron genes cuya expresión parecía errática, reduciendo la lista de interés a 36 genes.

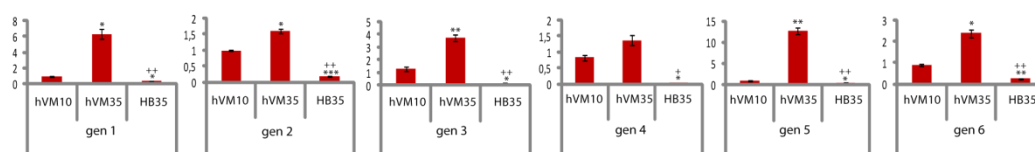
Tras incluir este último análisis redujimos a 36 el número de genes que serán considerados realmente de interés para futuros estudios de validación de los resultados del *microarray* y para investigar acerca de su relación con Bcl-X_L y la capacidad de promover el número de progenitores neuronales frente a gliales y de generación específica de neuronas dopaminérgicas.

V. Validación de los resultados del *microarray*.

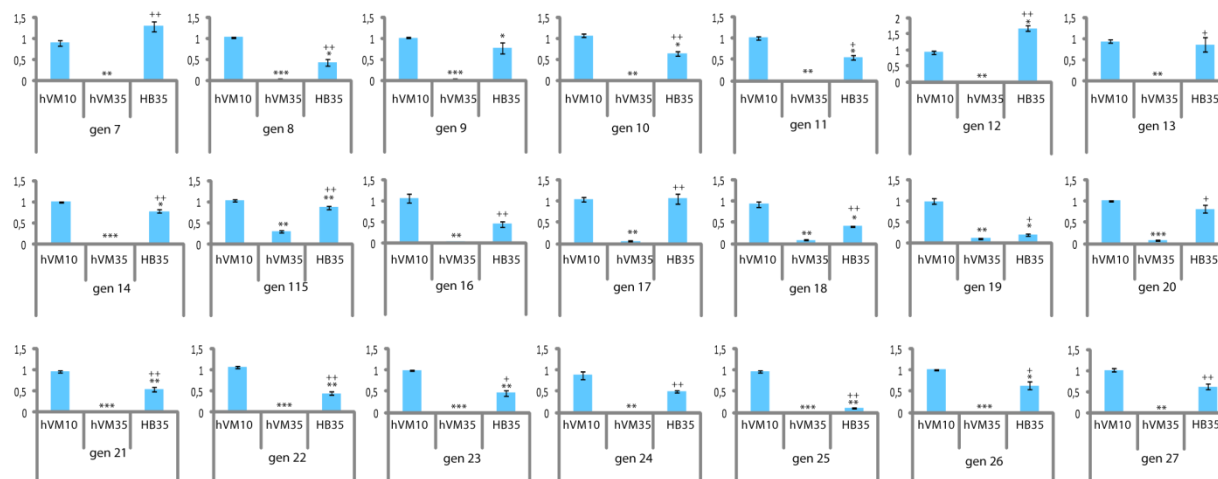
Con objeto de validar los resultados de los microarrays de ADN se analizó la expresión génica de cada uno de los 36 genes seleccionados anteriormente junto con los controles DCX, GFAP y TH mediante ensayos de Q-RT-PCR. Se analizaron nuevos triplicados biológicos de las células hVM1 a pase bajo (10) y pase alto (35) y de las células hVM1 high Bcl-X_L a pase 35 diferenciadas durante 4d, para que fuesen comparables con las muestras utilizadas en los *microarrays*. Como muestra calibradora a la que referir los resultados relativos de expresión génica se utilizaron las células hVM1 a pase 10.

Una vez analizados los resultados de la Q-RT-PCR observamos que de los 36 genes elegidos, no todos repiten los valores de expresión obtenidos en los *microarrays* de ADN. Nueve de ellos presentan una expresión de ARNm respecto de hVM10 diferente del patrón observado en los microarrays. Los 27 genes restantes se ajustan a un perfil de incremento o disminución de su expresión en hVM1 con los pases y con respecto de HB35 comparable a lo observado en los microarrays (ver figura 41).

Aumentan con los pases en hVM35 y no hay diferencias entre Bcl-X_L y hVM10, aumentan con los pases en hVM35 pero menos con Bcl-X_L o que HB35 presenta diferencias significativas con hVM10. Total: 6 genes



Disminuyen con los pases en hVM35 y no hay diferencias entre Bcl-X_L y hVM10, disminuyen con los pases en hVM35 pero menos con Bcl-X_L o que HB35 presenta diferencias significativas con hVM10. Total: 21 genes



Genes que no repiten su perfil de expresión tras la validación por Q-RT-PCR. Total: 9 genes.

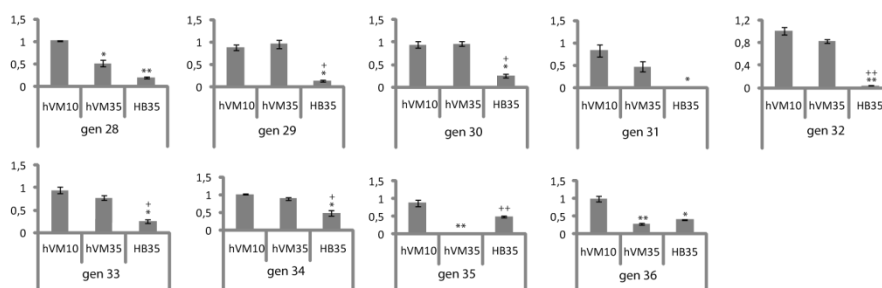


Fig. 41. Validación de los genes seleccionados como de interés tras un análisis exhaustivo de los microarrays de ADN mediante Q-RT-PCR.

El nombre de los genes permanece oculto ante la posibilidad de patentar su uso en biotecnología celular. Mediante Q-RT-PCR estudiamos los niveles de expresión de los 36 genes seleccionados junto a tres que nos sirven como control del experimental (*DCX*, *GFAP* y *TH*). Se analizaron triplicados biológicos de las células hVM1 a pase bajo (10) y pase alto (35) y de las células hVM1 high Bcl-X_L a pase 35 diferenciadas durante 4d, para que fuesen comparables con las muestras utilizadas en los *microarrays*. Como muestra calibradora a la que referir los resultados relativos de expresión génica se utilizaron las células hVM1 a pase 10. No todos los genes repiten los valores de expresión obtenidos en los *microarrays* de ADN. 9 de ellos presentan una expresión de ARNm respecto de hVM10 diferente del patrón observado en los *microarrays*. Los 27 genes restantes se ajustan a un perfil de incremento o disminución de su expresión en hVM1 con los pases y con respecto de HB35 comparable a lo observado en los *microarrays*. Los datos representan la media \pm ESM (n=3), *p<0,05 **p<0,01; ***p<0,001; t-test.

* Significativamente distinto de su valor en hVM10.

+ Significativamente distinto entre hVM35 y HB35.

Tras el exhaustivo estudio de los datos de expresión génica de los microarrays, validación por Q-PCR y búsqueda de correlaciones en bases de datos de expresión génica en ratón durante los días cruciales del desarrollo de las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas (GENSAT, Allen Brain Atlas), finalmente se han seleccionado un pequeño grupo de genes cuyas

funciones se describen a continuación. El nombre concreto de estos genes no puede ser desvelado en este manuscrito de tesis doctoral al tratarse de un documento público que anularía la posibilidad de patentar el uso de estos genes para su uso en biotecnología celular.

Los genes seleccionados se agrupan de la siguiente forma:

Proceso biológico	Patrón	número de genes
Oxido-reducción y desaminación	Aumenta en no neurogénicas	1
Metabolismo del grupo hemo	Aumenta en no neurogénicas	1
Señalización intracelular	Aumenta en no neurogénicas	2
Control ciclo celular	Desaparece en no neurogénicas	2
Factores de transcripción	Desaparece en no neurogénicas	5
Metabolismo de ARNm	Desaparece en no neurogénicas	2
Adhesión celular	Desaparece en no neurogénicas	1
Función desconocida (LOCn, FLJn)	Aumenta/disminuye en no neurog.	3

Tabla 8. Distribución de los genes que finalmente serán validados y de interés en futuros experimentos según su función en los procesos biológicos.

Del total de estos 17 genes, 14 tienen una función conocida. Además, la actividad de las proteínas codificadas por cuatro de ellos puede ser manipulada farmacológicamente, manipulando las condiciones de cultivo con ago/antagonistas. Los otros nueve (más los tres de función desconocida) están siendo clonados para llevar a cabo estudios moleculares y de desarrollo.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

1. PROPAGACIÓN CORRECTA DE LOS PRECURSORES MESENCEFÁLICOS.

Hace varios años se realizaron las primeras pruebas con trasplantes de tejido mesencefálico (embrionario o fetal) fresco humano cuyo objetivo era reponer las neuronas dopaminérgicas perdidas en los enfermos de Parkinson (Brundin et al., 2000a; Brundin et al., 2000b; Hauser et al., 1999), aportando la prueba de principio de que el reemplazamiento celular en la enfermedad de Parkinson era una buena estrategia para abordar la enfermedad. Era necesario mejorar algunos aspectos, como unificar protocolos, establecer cuál es el mejor tipo de tejido/células utilizado en los trasplantes y hacer una selección previa de los pacientes candidatos a este tipo de terapia. Antes de proseguir con las pruebas clínicas era necesario definir otros aspectos relacionados con las cuestiones éticas y de obtención del tejido que plantearía su uso rutinario. La principal cuestión era encontrar una fuente estable de neuronas dopaminérgicas alternativa al tejido embrionario o fetal humano. Para ello, se desarrollaron numerosos estudios centrados en la obtención de neuronas dopaminérgicas *in vitro* a partir de diversas fuentes como: células madre embrionarias (ESC), células madre neurales (NSC), células madre del adulto y las células madre pluripotentes inducidas (IPs). Todas ellas presentaban ventajas y desventajas a la hora de generar neuronas dopaminérgicas y aún no han pasado a la fase de ensayos clínicos.

Los resultados presentados en este trabajo junto con los datos obtenidos anteriormente (Courtois et al., 2010; Villa et al., 2009), muestran la posibilidad de generar una línea celular procedente del mesencéfalo ventral de fetos abortados humanos en semana 10 de gestación, que gracias a su inmortalización con v-myc puede ser fácilmente expandida *in vitro*. La línea celular hVM1 tras su inmortalización mantiene la multipotencialidad característica de las NSC, ya que tras la retirada de los mitógenos del medio de cultivo pueden generar células de los tres linajes principales del sistema nervioso central (neuronas, oligodendrocitos y astrocitos) (ver apartado de resultados previos en la introducción). Al mantener una cierta especificación adquirida en su región de origen y tras ser expuestas a unas condiciones de cultivo óptimas, las NSC obtenidas del mesencéfalo ventral producen más neuronas dopaminérgicas que las que proceden de otras regiones del sistema nervioso (Horiguchi et al., 2004; Jensen and Parmar, 2006; Ostenfeld et al., 2002; Schwarz et al., 2006).

Gracias a los estudios de las proteínas de unión a calcio concluimos que las células hVM1 son calretinina positivas y calbindina y parvalbúmina negativas (figura 2 Resultados). Estos datos junto con la expresión positiva de GIRK2 y otros marcadores dopaminérgicos (NURR1, PITX3, EN1, LMX1b, LMX1a Y DAT) determinan que la línea celular hVM1 tras su diferenciación *in vitro*, es capaz de generar neuronas dopaminérgicas con un fenotipo A9. De acuerdo con los estudios de trasplantes previamente realizados en animales y humanos (Mendez et al., 2005; Thompson et al., 2005) se ha visto que sólo las neuronas dopaminérgicas de tipo A9 pueden reinervar eficazmente el estriado. Además, en el contexto de terapia de reemplazamiento celular en enfermedad de Parkinson, se ha demostrado que únicamente las NSC procedentes de la región del cerebro medio aisladas a día E12-15 en ratón o semana 6-9 post-fertilización en humanos (Olanow et al., 1996) pueden diferenciarse como neuronas dopaminérgicas maduras y funcionales. La línea celular hVM1 descrita en este trabajo cumpliría ambos requisitos ya que presenta un fenotipo de tipo A9 y fue obtenida a partir de tejido fetal de la edad recomendada. La obtención de células a partir de fetos de 10 semanas requiere una disección precisa de los tejidos mesencefálicos y un buen protocolo de disgregación celular y conservación de los cultivos. Por ello es necesario comprobar posteriormente las características fenotípicas de las neuronas generadas en cultivo. Es importante destacar que las células TH positivas obtenidas a partir de los cultivos hVM1 según nos indican los datos de expresión de estas proteínas mencionados anteriormente, no tienen una mezcla de poblaciones derivadas de células procedentes de la SNpc (A9) y el VTA (A10).

Por tanto, podemos concluir que las células hVM1 tras su inmortalización y expansión *in vitro*, recuerdan su identidad regional de mesencéfalo ventral y generan un 12% de neuronas dopaminérgicas con un fenotipo similar a las de la Sustancia Negra *pars compacta* tras la diferenciación de los cultivos.

Sin embargo, tras largos periodos de tiempo en cultivo y a pesar de la inmortalización, la línea celular hVM1 sufría una pérdida en la capacidad de neurogénesis y los porcentajes de neuronas dopaminérgicas disminuían drásticamente. Este problema de pérdida de potencialidad de las NSC con los pases ha sido ampliamente descrito en cultivos de neuroesferas obtenidas a partir de tejido mesencefálico fetal (Chung et al., 2006; Storch et al., 2001; Studer et al., 2000; Svendsen et al., 1996; Svendsen et al., 1998). Durante varios pases más de lo que permiten los cultivos de neuroesferas, la inmortalización con v-myc, permite que la línea celular hVM1 puede ser expandida *in vitro* conservando un alto rendimiento de generación de neuronas y concretamente de neuronas dopaminérgicas. Para abordar el problema de la pérdida de capacidad neurogénica en las NSC se han utilizado diversos protocolos, como la adición de factores relacionados con el cerebro medio (interleucinas,

GDNF, BDNF, dbAMPC, forskolina.... (Perrone-Capano et al., 2000; Vescovi et al., 1999)) la sobre-expresión de factores de transcripción relacionados con el desarrollo del sistema dopaminérgico o la inmortalización. Sin embargo su eficiencia continua siendo limitada.

En nuestro caso, estudios previos realizados en células derivadas de cerebro anterior (Liste 2004), llevaron a la sobre-expresión de Bcl-X_L en las hVM1 y a la generación de la línea hVM1 high Bcl-X_L. La expresión forzada de Bcl-X_L a pase bajo en las células hVM1 inmortalizadas permitía su propagación durante largos periodos de tiempo *in vitro* manteniendo su capacidad neurogénica. Como se muestra en esta tesis, la expresión de Bcl-X_L preserva la capacidad neurogénica a pases altos (ver apartado 6, resultados previos de la Introducción), sin que las neuronas dopaminérgicas generadas olviden su identidad regional, ya que mantienen la expresión de CALRETININA, GIRK2, NURR1, PITX3, EN1, LMX1b y DAT.

2. CONTROL GENÉTICO DEL DESARROLLO DE LAS NEURONAS DOPAMINÉRGICAS. EFECTO DE BCL-X_L.

Los precursores de las neuronas dopaminérgicas de los grupos A8 (campo retrorrubral), A9 (Sustancia Negra *pars compacta*) y A10 (área del tegmento ventral) se encuentran localizados en el flexo cefálico de los vertebrados superiores, que durante el desarrollo embrionario se corresponde con el dominio ventral del mesencéfalo y el diencefalo. Los datos más recientes han establecido la línea media ventral del tubo neural como la región del neuroeje donde se originan todas las neuronas dopaminérgicas (*floor plate*). Sin embargo, el origen preciso de las diferentes subpoblaciones de neuronas dopaminérgicas a lo largo del eje antero-posterior entre el cerebro medio y el diencefalo caudal está todavía por conocer.

La identidad de cada neurona dopaminérgica mesencefálica es especificada durante el desarrollo como si fuese un único punto dentro de una compleja red cuatridimensional (espacio tridimensional + tiempo) en la que interaccionan moléculas de señalización y factores de transcripción (Prakash and Wurst, 2006; Smidt and Burbach, 2007). Algunos de los factores utilizados en las etapas tempranas de especificación, son posteriormente empleados para un proceso diferente en las etapas finales del desarrollo de las neuronas dopaminérgicas, dependiendo su función por tanto de su expresión espaciotemporal y de la disponibilidad de rutas de actuación o de dianas trascipcionales. La progresión correcta de la cascada de señalización y la activación de los factores de transcripción necesarios en la región del límite entre cerebro medio y cerebro posterior, hace que en esta zona los precursores

mesencefálicos se conviertan en progenitores neuronales y finalmente en neuronas dopaminérgicas maduras (ver apartado 3 en la Introducción). Los modelos de roedor (sobre todo de ratón) han sido los modelos clásicos de estudio para descubrir esta compleja red de señalización, debido a su relación filogenética con los humanos y su fácil manipulación genética para el estudio de los mutantes de función de los distintos genes implicados en la adquisición de un fenotipo dopaminérgico maduro.

La generación de una neurona dopaminérgica mesencefálica madura desde una célula madre pluripotente del neuroepitelio puede subdividirse en cuatro etapas: i) inducción, generación en el tubo neural de una región competente para albergar los futuros progenitores dopaminérgicos; ii) especificación, neurogénesis y compromiso de los precursores neuronales de la región ventral del cerebro medio y el diencefalo caudal hacia un destino dopaminérgico y diferenciación temprana; iii) diferenciación final, los progenitores comprometidos progresan hacia neuronas dopaminérgicas maduras y iv) mantenimiento y supervivencia en el adulto de las neuronas dopaminérgicas generadas.

En el proceso de inducción se delimita la región del cerebro medio apta para el desarrollo de las futuras neuronas dopaminérgicas y participan moléculas secretadas como Shh, Wnt1 y Fgf8 y factores de transcripción como OTX2 y EN1. Durante la inducción y la especificación temprana, los precursores mesencefálicos de la *floor plate* que reciben las señales adecuadas se convierten en progenitores neuronales, que proliferan y van adquiriendo un compromiso hacia neurona dopaminérgica a la vez que van descartando otros destinos de diferenciación. Este proceso es más complejo y está mediado tanto por proteínas secretadas como por factores de transcripción como SOX2, NEUROGENINA2, MASH1, LMX1a y MSX1. Las células hVM1 y hVM1 high Bcl-X_L descritas en este trabajo expresan todos estos factores (apartado 1, I-II de Resultados). Según el patrón temporal de expresión descrito en ratón y los estudios realizados en humanos, podemos decir que ambas líneas celulares fueron aisladas a partir del mesencéfalo ventral de fetos humanos abortados cuando el tejido del que proceden ya había sido correctamente inducido y se habían generado los progenitores neuronales comprometidos hacia fenotipo dopaminérgico correspondientes. Es importante resaltar que la línea celular hVM1 tras la immortalización y el posterior cultivo *in vitro* durante 12-14 pases no olvida su origen mesencefálico y mantiene la expresión de todos estos genes necesarios para la aparición de las neuronas dopaminérgicas. También es importante resaltar que, aunque las células del tejido de origen ya tenían un cierto grado de compromiso y diferenciación, una vez puestas en cultivo son capaces de generar un *pool* de precursores neuronales que pueden ser expandidos *in vitro*.

En el caso de las células hVM1 high Bcl-X_L observamos un patrón de expresión de estos factores de transcripción diferente del que presentan las células hVM1. En hVM1 high Bcl-X_L la expresión de *OTX2* y *SOX2* aumenta con los días de diferenciación. A 4d encontramos mayores niveles de expresión relativa de ARNm de *OTX2* en hVM1 high-Bcl-X_L (ver figura 3 de Resultados). A parte de delimitar la región entre cerebro medio y cerebro posterior, *OTX2* está implicado en la proliferación de progenitores y la salida del ciclo celular de los mismos. Los experimentos de ganancia/pérdida de función de *OTX2* alteran la expresión de genes como *LMX1a*, *MSX1*, *NGN2* y *MASH1* (Omodei et al., 2008; Vernay et al., 2005). Además, la sobre-expresión de *OTX2* causa una expansión ventral del dominio de expresión de *Wnt1*, un incremento de la *CiclinaD1* y una disminución del inhibidor de ciclinas dependiente de quinasas p27^{Kip1} (*Cdkn1b*) (Omodei et al., 2008; Shtutman et al., 1999). Estos estudios indican que *OTX2* puede controlar indirectamente la proliferación y la salida del ciclo celular de los precursores de neuronas dopaminérgicas a través de la regulación de la expresión de *Wnt1* (la vía canónica de *Wnt* está relacionada con la regulación de la *CiclinaD1*) y controlando la cascada *LMX1A/MSX1/NGN2*. Además, *OTX2* reprime la expresión de *NKK.2.2*, lo que favorece la diferenciación preferencial de las neuronas hacia un fenotipo dopaminérgico que (Puelles et al., 2004). Otro factor de transcripción importante en estadios tempranos de la especificación dopaminérgica es *SOX2*. Si nos fijamos en los ratios de expresión comparando ambas líneas celulares observamos que las células hVM1 high Bcl-X_L poseen de partida menor cantidad relativa de ARNm de *SOX2* que las células hVM1 (ver figura 3 de resultados). Durante la diferenciación temprana de los cultivos la expresión de este factor aumenta en la línea hVM1 high Bcl-X_L hasta igualar su expresión a la de hVM1. Otros grupos han determinado que *SOX2* es un factor clave para conferir una identidad neuronal al *pool* de precursores y mantenerlos en un estado de progenitores neuronales proliferativos (Bylund et al., 2003). A su vez, cuando nos centramos *NEUROGENINA2* vemos como hay un pico de expresión en ambas líneas celulares a los 5d de diferenciación. Sin embargo, a 0d hay una mayor cantidad relativa de ARNm de *NEUROGENINA2* en las células hVM1 high Bcl-X_L (ver figura 3 de resultados). Este factor de transcripción es un regulador indispensable en la neurogénesis de las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas (Andersson et al., 2006; Andersson et al., 2007), promoviendo la adquisición de un fenotipo neuronal genérico y reprimiendo gliogénesis en los progenitores mesencefálicos (Bertrand et al., 2002). Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en la línea hVM1 high Bcl-X_L para estos tres factores de transcripción junto con datos previos que muestran un 90% de la población positiva para nestina y vimentina (Courtois et al., 2010; Villa et al., 2009) a 0d, podríamos decir que en esta línea celular la mayor expresión de *OTX2* retrasaría la salida del ciclo celular de los precursores mesencefálicos. Esto permitiría que

dichos precursores continuasen proliferando, aumentando su número en los cultivos. Además, estos precursores resultan ser *SOX2* positivos, lo que permitiría tras 4d de diferenciación igualar el número de progenitores mesencefálicos que seguirán un destino neuronal a los que encontraríamos en un cultivo genuino de mesencéfalo ventral que no hubiese sufrido la pérdida de capacidad neurogénica con los pases *in vitro* (hVM1 a pases bajos). La mayor expresión de *NEUROGENINA2* en las células hVM1 high Bcl-X_L respecto de hVM1, apoyaría los datos obtenidos e indicaría que los progenitores generados en la línea hVM1 high Bcl-X_L optan preferentemente por un fenotipo neuronal y no glial. Por tanto, la expresión forzada de Bcl-X_L en células hVM1 parece incrementar el número de precursores mesencefálicos y de progenitores neuronales en cultivos *in vitro*.

En la especificación temprana de los progenitores neuronales hacia neurona dopaminérgica intervienen diversos factores de transcripción como *LMX1b*, *NURR1* y *PITX3*. Todos ellos se expresan en las células hVM1 y hVM1 high Bcl-X_L (figura 4 de Resultados) y presentan un patrón de aumento según avanza la diferenciación a excepción de *PITX3*. Observamos una disminución significativa de la expresión de *PITX3* en hVM1 a los 4d de diferenciación, mientras que en las células hVM1 high Bcl-X_L justo a ese día de diferenciación encontramos su pico de máxima expresión. El papel de *PITX3* en la diferenciación dopaminérgica ha sido ampliamente estudiado. Activa el promotor de TH *in vitro*, rescata a *NURR1* de su estado reprimido (Jacobs et al., 2009) y participa en la regulación del enzima *ALDH1a1*, controlando la síntesis de ácido retinoico (Jacobs et al., 2007). Por tanto *PITX3* juega un papel importante en la diferenciación de las neuronas dopaminérgicas de diversas maneras: i) actúa sobre *NURR1* cuya expresión es necesaria para que las células TH positivas expresen *VMAT2* y *DAT* y adquieran su fenotipo maduro (Smidt and Burbach, 2007); ii) regula directamente la expresión de TH interaccionando con su promotor; y iii) juega un papel importante en la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas generadas posiblemente controlando la producción de ácido retinoico. El fallo en la activación de *PITX3* a los 4d de diferenciación podría explicar por qué a partir de un número similar de progenitores neuronales en la línea hVM1 obtenemos un menor porcentaje de neuronas dopaminérgicas tras la diferenciación de los cultivos que el que se alcanza a partir de la línea celular hVM1 high Bcl-X_L (un 30% menos a los 30d de diferenciación). Además, una menor cantidad de *NURR1* a 7d en las células hVM1 podría ser otra causa más del menor número de células TH positivas que se obtiene en estos cultivos. *NURR1* actúa sobre el promotor de TH pero también interacciona con p57^{kip2} induciendo arresto del ciclo celular (Joseph et al., 2003). Esto determina que los progenitores neuronales inicien su programa de diferenciación hacia

neurona dopaminérgica. De esta forma, en las células hVM1 high Bcl-X_L una mayor expresión de *NURR1* llevaría a una generación mayor de progenitores neuronales que se vuelven postmitóticos. Por tanto, Bcl-X_L actúa directa o indirectamente sobre la expresión de *NURR1* y especialmente de *PITX3*, incrementando su expresión en el momento propicio de la diferenciación de los progenitores neuronales hacia su fenotipo neuronal y aumentando así el número de neuronas dopaminérgicas en los cultivos.

Una vez que las neuronas generadas a partir de estos cultivos celulares son TH positivas entran en la fase de diferenciación final y de maduración/mantenimiento. Tras analizar el patrón temporal de expresión de TH en ambas líneas celulares, podemos decir que su expresión (incluyendo un pico máximo a 7d y su posterior estabilización) ocurre antes durante la diferenciación en las células hVM1 high Bcl-X_L. Además, en este trabajo se ha demostrado que las neuronas dopaminérgicas generadas a partir de ambas líneas celulares expresan los genes necesarios para su correcta actividad (*AADC*, *GTPCH*, *DAT*, *VMAT2*, *DRD2* Y *GIRK2*), pero con un perfil distinto para cada una de ellas a lo largo de la diferenciación (figura 5 y 6 de Resultados). En la línea celular hVM1 high Bcl-X_L las neuronas dopaminérgicas aparecen antes, y ya a los 12d de diferenciación poseen los niveles necesarios de cada uno de estos genes para ejercer su correcta actividad neurotransmisora. Sin embargo, en hVM1 las neuronas dopaminérgicas presentan un pico de expresión de TH más tardío (12d) y los niveles de expresión relativa de ARNm para *DAT*, *VMAT2*, *DRD2* Y *GIRK2* van aumentando hasta los 30d de diferenciación. Podemos concluir que las neuronas dopaminérgicas de los cultivos de células hVM1 high Bcl-X_L se generan antes que en hVM1 y que, tras 30d de diferenciación, tienen una mayor expresión de proteínas relacionadas con maduración y funcionalidad (*DAT*, *VMAT2* y *DRD2*). La expresión forzada de Bcl-X_L adelantaría la aparición de las neuronas dopaminérgicas en cultivo, alcanzando su porcentaje máximo frente a células totales unos días antes que las células hVM1, lo que permitiría que las neuronas dopaminérgicas generadas adquiriesen un mayor grado de diferenciación/maduración tras 30d *in vitro*.

Las neuronas obtenidas a partir de ambas líneas celulares poseen receptores para otros neurotransmisores (GABA, glutamato y acetilcolina, figura 9 de Resultados) cuya función es importante en el sistema nigroestriatal, ya que modulan la actividad electrofisiológica de las neuronas dopaminérgicas y regulan los niveles de dopamina extracelular. Además, es importante resaltar que aunque a partir de las células hVM1 y hVM1 high Bcl-X_L se generan neuronas gabaérgicas y glutamatérgicas en un bajo porcentaje, no se han detectado neuronas serotoninérgicas en estos cultivos. Estudios recientes han relacionado la excesiva innervación serotoninérgica encontrada en el estriado de pacientes de Parkinson trasplantados con tejido

fetal mesencefálico con la aparición de disquinesias (Politis et al., 2010). Por tanto, en las terapias de reemplazamiento celular para la enfermedad de Parkinson habría que reducir/eliminar el componente serotoninérgico antes de realizar el trasplante para minimizar los riesgos de aparición de movimientos involuntarios. En este contexto, las células hVM1 y hVM1 high Bcl-X_L serían una buena fuente de neuronas dopaminérgicas debido a su casi nula (<0,1%) generación de neuronas serotoninérgicas *in vitro*.

3. FUNCIONALIDAD.

Para que las neuronas dopaminérgicas sean funcionales deben poseer activa la maquinaria de síntesis, liberación, recaptura y transporte de dopamina, y además presentar unas propiedades morfológicas, electrofisiológicas y de respuesta a iones específicas de este fenotipo neuronal.

Los patrones de arborización de las neuritas establecidos durante el desarrollo son característicos de cada subpoblación neuronal y están relacionados con su función. El tamaño y la forma de la arborización determinan la integración de las conexiones sinápticas (Gulledge et al., 2005). Las alteraciones en la arborización de las neuritas han sido descritas en numerosas neuropatologías como el retardo mental, la esquizofrenia y la enfermedad de Alzheimer (Anderton et al., 1998; Harrison, 1999; Kaufmann and Moser, 2000). En este caso observamos que el patrón de arborización de las células hVM1 y hVM1 high Bcl-X_L *in vitro* presenta algunas diferencias durante la diferenciación de los cultivos respecto del observado en cultivos primarios de ratón de mesencéfalo ventral (apartado 1.III de Resultados). Dichas diferencias son mínimas y pueden ser obviadas de manera general. El número medio de neuritas es similar en ambas líneas celulares humanas, excepto el de neuritas secundarias a 30d de diferenciación que es ligeramente menor en hVM1 high Bcl-X_L. La longitud media de cada tipo de neurita durante la diferenciación también es similar entre hVM1 y hVM1 high Bcl-X_L, aunque la longitud total de las neuritas varía dependiendo del tipo celular: en hVM1 disminuye a los 20d de diferenciación para aumentar a los 30d, mientras que en hVM1 high Bcl-X_L partimos de una longitud de neuritas que aumenta con los días de diferenciación (primarias, terciarias y cuaternarias) o que se mantiene desde el día 12 al 30 (secundarias). La disminución a 20d en el caso de hVM1 podría coincidir en el tiempo con un periodo de mayor mortalidad celular en los cultivos, afectando ésta a los procesos de emisión de prolongaciones temporalmente. Algunos estudios han demostrado el papel de Bcl-2 vía activación de JNK en la

extensión de las neuritas en las neuronas dopaminérgicas (Eom et al., 2004). También se cree que Bcl-X_L está implicado en esta extensión, aunque su vía de actuación continúa sin conocerse. Por tanto, la sobre-expresión de Bcl-X_L en estas células podría estar estimulando la extensión de las neuritas mediante una vía de señalización desconocida y protegiéndolas a su vez de una muerte/degeneración celular mediante su conocido papel antiapoptótico. Esto originaría las diferencias existentes entre ambas líneas celulares a la hora de extender sus neuritas durante la progresión de la diferenciación, ya que las células hVM1 high Bcl-X_L adquirirían antes su patrón de arborización definitivo, con menores pasos de extensión-pérdida-retracción de las prolongaciones no necesarias. Aunque existen diferencias mínimas en el patrón de arborización de las células hVM1 y hVM1 high Bcl-X_L respecto de cultivos primarios de ratón de mesencéfalo ventral, entre ambas líneas celulares humanas no se han encontrado diferencias significativas.

Una vez probada la existencia de dopamina intra y extracelular en estas dos líneas celulares (ver apartado 6, resultados previos en la Introducción y Villa et al. 2009, Courotis et al. 2010), fue necesario demostrar la expresión de VMAT2 y la funcionalidad de DAT en los cultivos diferenciados 30d. La neurotransmisión de la dopamina está controlada por un complejo balance homeostático entre la cantidad de dopamina sintetizada, almacenada en vesículas, liberada, re-capturada vía DAT y metabolizada. La expresión de VMAT2 en hVM1 y hVM1 high Bcl-X_L asegura un correcto almacenamiento de la dopamina citoplasmática en vesículas, disminuyendo así su toxicidad y permitiendo su transporte para una posterior liberación. Mediante diversos estudios, hemos demostrado cómo DAT se encuentra activo y funcional en los cultivos diferenciados de células hVM1 y hVM1 high Bcl-X_L (sección 1.IV de Resultados). DAT pertenece a una familia de transportadores dependientes de Na⁺/Cl⁻ y se expresa selectivamente en las neuronas dopaminérgicas. Su función es transportar la dopamina del espacio extracelular de vuelta a las neuronas que la han liberado, regulando de esta manera la dinámica espacio/temporal de la dopamina extracelular. La pérdida o el daño de alguno de estos dos genes provocarían fallos en la homeostasis de la dopamina y originaría daños tóxicos en las neuronas dopaminérgicas. Por tanto, es importante resaltar que tanto en los cultivos hVM1 como en hVM1 high Bcl-X_L las neuronas dopaminérgicas generadas están equipadas con VMAT2 y un DAT funcional, no encontrando diferencias significativas tras la expresión forzada de Bcl-X_L. Además, las neuronas generadas a partir de ambas líneas celulares poseen receptores para los neurotransmisores glutamato, GABA y acetilcolina (figura 9 de resultados). La presencia de dichos receptores es importantes ya que las neuronas dopaminérgicas que degeneran en la enfermedad de Parkinson, pertenecen a la vía

nigroestriatal de los ganglios basales, en la cual la actividad motora se regula mediante la liberación de estos neurotransmisores. Una fuente óptima de neuronas dopaminérgicas para terapias de reemplazamiento celular debería incluir células que posean receptores para estos tres neurotransmisores, ya que a través de ellos se regulará su actividad.

Finalmente, estábamos interesados en conocer las propiedades de excitabilidad de estos cultivos. Las neuronas dopaminérgicas generadas a partir de células hVM1 y hVM1 high Bcl-X_L presentan los canales para iones de calcio, sodio y potasio (Ca_v1.2, Ca_v2.1, Ca_v2.2, PanNa_v y K_v3.4) necesarios para su correcta despolarización y repolarización. Dichas neuronas pueden ser excitadas mediante la aplicación de estímulos de alto K⁺, y además, incrementan sus niveles de Ca²⁺ intracelular en respuesta a neurotransmisores relacionados con la funcionalidad de neuronas A9 de Sustancia Negra pars compacta (glutamato y GABA, figura 19 de Resultados). Esto indicaría la presencia de receptores funcionales para estos neurotransmisores y sugiere la presencia de algún tipo de sinapsis. En el caso de las células hVM1 high Bcl-X_L, hemos detectado la existencia de oscilaciones periódicas del calcio intracelular. Se ha demostrado que existen oscilaciones espontáneas de calcio intracelular en cultivos de neuronas dopaminérgicas obtenidas a partir de mesencéfalo ventral de ratón (Yasumoto et al., 2004) y en *slices* o rodajas del cerebro de ratón en la región de la Sustancia Negra pars compacta, donde aproximadamente el 90% de las neuronas son dopaminérgicas (Tsuneki et al., 2000). Estas oscilaciones del calcio intracelular son el resultado de potenciales de acción espontáneos y sincrónicos que ocurren en la red sináptica neural, y que son importantes para mantener niveles basales de dopamina necesarios para el funcionamiento apropiado del sistema nigroestriatal (Wilson and Callaway, 2000). Podemos concluir que las células hVM1 después de su inmortalización y expansión *in vitro* expresan la maquinaria necesaria para una correcta actividad neuronal. La expresión forzada de Bcl-X_L no altera la funcionalidad de las neuronas generadas a este nivel. La respuesta de las células al neurotransmisor GABA aumentando el calcio intracelular, indicaría que aún poseen un grado de maduración bastante inmaduro (Tonnesen et al., 2010).

El siguiente paso en los estudios de funcionalidad fue analizar las propiedades electrofisiológicas de ambas líneas celulares. Las propiedades electrofisiológicas de las neuronas dopaminérgicas han sido ampliamente estudiadas tanto *in vitro* como *in vivo* durante los últimos 25 años mediante diferentes técnicas. Se puede decir que las neuronas dopaminérgicas de sustancia negra presentan unas características distintivas *in vitro* como: potenciales de acción largos (≥ 2 ms), un alto umbral de despolarización (-30 a -40mV), una etapa inicial del potencial de acción bifásica con una depresión al principio, un pico con una

amplitud de +30mV y una prominente y larga fase de hiperpolarización (Liss B y Roeper 2010). Además, las neuronas dopaminérgicas de A9 tienen un comportamiento característico denominado actividad en marcapasos. Presentan una actividad electrofisiológica constante, al generar de manera regular y tónica potenciales de acción de baja frecuencia. La causa para esta actividad en marcapasos podría ser la existencia de actividad sináptica dependiente de la activación de receptores de glutamato tipo NMDA (Kuznetsov et al. 2004). Diversos estudios han caracterizado la generación de neuronas dopaminérgicas *in vitro* a nivel de fenotipo, pero sólo unos pocos realizados a partir de células madre neurales han incluido el estudio de las propiedades funcionales de las neuronas dopaminérgicas generadas (Cho et al., 2008; Cho et al., 2002; De Filippis et al., 2007; Donato et al., 2007; Jung et al., 1998; Lotharius et al., 2002; Park et al., 2005; Vazin et al., 2009). Muchos de ellos fallan en la demostración de la maduración de las neuronas generadas, ya que no presentan potenciales de acción verdaderos (Cho et al., 2002; De Filippis et al., 2007; Donato et al., 2007; Jung et al., 1998). Mediante *whole cell patch-clamp* hemos demostrado la presencia de dos sub-poblaciones de células en los cultivos diferenciados de hVM1 y hVM1 high Bcl-X_L (apartado 1.VII de Resultados). Una con propiedades activas de membrana típicas de fenotipos neuronales y otra con propiedades pasivas que apuntan a un fenotipo glial. Las células de la población neuronal presentan potenciales de acción inmaduros tras su despolarización y muestran una rectificación del potencial de membrana tras la aplicación de estímulos hiperpolarizantes. Una de las células analizadas perteneciente a los cultivos de hVM1 fue capaz de desencadenar trenes de potenciales de acción tras ser despolarizada. Como los fenotipos de las células estudiadas electrofisiológicamente no pudieron ser determinados, sólo podemos especular acerca de la naturaleza de las células analizadas. Ya que la mayor parte de las neuronas generadas en estos cultivos son TH positivas y teniendo en cuenta que los potenciales de acción obtenidos presentan una larga duración (>2ms), un alto umbral de despolarización, un pico con una amplitud de +20mV y una prominente y larga fase de hiperpolarización, podemos decir que existen suficientes evidencias para concluir que los cultivos de células hVM1 y hVM1 high Bcl-X_L tienen el potencial de alcanzar propiedades neuronales típicas de neuronas dopaminérgicas mesencefálicas. Puede ser que las células en cultivo no puedan llegar a alcanzar unas propiedades electrofisiológicas totalmente maduras. Lo importante es que después de tanto tiempo en cultivo muestren la capacidad de responder a estímulos excitatorios y generen potenciales de acción aunque sean inmaduros. Esto nos indica que la maquinaria necesaria para ser funcionales está disponible, aunque el entorno de cultivo *in vitro* probablemente no sea el ideal para que se desarrolle completamente.

4. MARCAJE DE CÉLULAS TRONCALES NEURALES CON NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS.

Los estudios realizados en las células hVM1 high Bcl-X_L nos han permitido establecer la metodología correcta para llevar a cabo el marcaje de células troncales neurales humanas con NNP (apartado 2 de Resultados). Es importante destacar que después de estos estudios pudimos simplificar el protocolo de marcaje e incubación respecto de los empleados hasta el momento, hallando un tipo de NNP (NNP-100-Dx-R) que podía ser incorporada por las hNSC en un número elevado sin utilizar ningún tipo de agente de transfección (Arbab et al., 2003; Focke et al., 2008; Neri et al., 2008). Estas NNP-100-Dx-R pueden ser aplicadas a una concentración de hierro de 50µg/ml, lo que no provoca cambios en los cultivos celulares a nivel de proliferación (fases del ciclo celular), ni de diferenciación (no alteran la proporción de cada uno de los fenotipos esperados para esta línea celular) ni de viabilidad celular. Además, poseen una fuerte fluorescencia roja, lo que simplifica su detección tanto *in vitro* como *in vivo*. Sin embargo, no hemos sido capaces de establecer su localización a nivel subcelular. Las NNP penetran en el interior de las células hVM1 high Bcl-X_L, pero una vez en el citoplasma no se encuentran en el interior de endosomas ni de lisosomas. Esto puede contribuir a su fácil dilución con los pases, ya que la marca disminuye un 64% tras un pase, otro 64% al segundo pase y un 84% al tercer pase, hallando finalmente sólo un 2% de células marcadas en pase3. La pérdida del marcaje con NNP ha sido descrito anteriormente para diferentes tipos de NNP y en distintos tipos celulares (Arbab et al., 2003; Bulte and Kraitchman, 2004; Sun et al., 2005). En este caso, las NNP pueden perderse en el medio con cada división celular y/o repartirse entre las células hijas. Al disminuir su número en el interior de cada célula, disminuye también la capacidad para que sean detectadas con las técnicas utilizadas.

Los experimentos *in vitro* proporcionaron los datos necesarios para poner a punto el marcaje de las células hVM1 high Bcl-X_L con NNP e iniciar los estudios de seguimiento *in vivo* de la señal emitida por células hVM1 high Bcl-X_L+NNP-100-Dx-R trasplantadas en modelos hemiparkinsonianos de roedor. Mediante los primeros experimentos *in vivo*, concluimos que mediante nuestro protocolo de marcaje *in vitro* varios tipos de NNP eran aptos para ser utilizados como agentes de contraste en IRM, siendo las NNP-100-Dx-R las que producían una mayor intensidad en la señal obtenida. Los estudios longitudinales demostraron que la señal podía ser detectada mediante IRM eficientemente hasta 5 meses después del trasplante. Sin embargo, al analizar más en detalle los trasplantes a tiempos largos, observamos que la señal

identificaba la región del trasplante pero la mayoría de las NNP se encontraban fuera de las células trasplantadas y pasaban a formar acúmulos en el borde del trasplante o habían sido incorporadas por la microglía reactiva de la rata. La mayoría de los trabajos realizados hasta la fecha utilizan otra metodología para detectar las NNP en los trasplantes (tinción de azul de Prusia) menos precisa y limpia que su visualización mediante microscopía de fluorescencia (Arbab et al., 2003; Focke et al., 2008; Neri et al., 2008). Además, estos estudios se paran tras 1-2 meses post-trasplante, por lo que puede que las NNP todavía estén en un número elevado en el interior de las células o pueden no estar discriminando correctamente entre NNP que se encuentran en el interior o en los alrededores de las células trasplantadas debido a la metodología empleada. Por tanto, hay que tener en cuenta que la señal obtenida mediante IRM a largos periodos de tiempo post-trasplante, muestra las células trasplantadas pero también las NNP que se encuentran entre ellas y las que han sido incorporadas por la microglía. La salida de las NNP del interior celular puede deberse a la existencia de uno o dos eventos de proliferación antes de que las células comiencen su diferenciación *in vivo*. Esto apoyaría la idea de que con cada división celular parte de la carga de NNP de la célula madre se pierde en el medio extracelular, pasando en este caso a acumularse en el tejido del estriado de la rata trasplantada.

El objetivo último para el desarrollo de toda esta metodología era poder identificar de forma no invasiva, sin dañar al animal, la localización exacta de un trasplante de células marcadas realizado en el estriado lesionado de ratas hemiparkinsonianas, seguir su evolución en el tiempo y realizar estudios *in vivo* que aportasen información sobre la funcionalidad (a nivel dopaminérgico) del trasplante antes de sacrificar al animal. En este contexto, optamos por realizar un primer estudio de PET utilizando ^{11}C -DHTBZ (ligando de VMAT2). Hay pocos estudios de PET realizados en animales con este trazador (Collantes et al., 2008; Sossi et al., 2007) y este experimento se enfocó como una prueba para determinar cuál sería el mejor protocolo de administración del radioligando, el ajuste de la señal según las coordenadas anatómicas del animal y determinar su sensibilidad/especificidad. Se obtuvieron buenos resultados en la rata control, pudiendo distinguir perfectamente la señal obtenida en estriado intacto y ausente del lesionado (ver figura 37 de Resultados). Sin embargo, pese a los buenos resultados obtenidos con la rata control, no pudimos dar como positivos los resultados obtenidos en los animales trasplantados con células, ya que el trasplante con hVM1 high Bcl-X_L+NNP-100-Dx-R presentaba señal de ^{11}C -DHTBZ en el hemisferio lesionado aunque el análisis posterior del trasplante mostraba un fenotipo muy inmaduro del mismo en el que no se encontraron células TH positivas. Por tanto, la señal detectada mediante PET en este estriado trasplantado no puede atribuirse a neuronas dopaminérgicas generadas a partir del trasplante

que tuviesen un VMAT2 funcional. Podría deberse a restos de neuronas o fibras dopaminérgicas en el estriado, si la lesión con 6-OHDA en esta rata no hubiese sido realmente total. En ningún momento ha podido asociarse la falta de madurez de los trasplantes con la presencia de NNP, ya que los animales trasplantados con células sin marcar tampoco alcanzaban el grado de diferenciación observado en experimentos anteriores (Courtois et al., 2010). La señal también podría ser debida a un efecto artefactual del trasplante sobre el tejido del estriado. Puede ser también que la cirugía y el depósito de células dañasen la microvasculatura de la zona, haciendo que el lavado de la sonda en esta área fuese más lento o incompleto y esto produjese una señal artefactual que observamos en PET. También podría deberse a una captura inespecífica de la sonda por las células de fenotipo inmaduro del trasplante o por la microglía reactiva de la rata que se encuentra activa en esta región. En vista de todas estas posibilidades será necesario realizar más experimentos en el futuro para tratar de mejorar la técnica y determinar si es posible evaluar la funcionalidad de un trasplante in vivo. Para ello habría que someter a PET a los animales lesionados antes del trasplante de las células, asegurando de esta manera la ausencia completa de señal en las ratas seleccionadas para el trasplante. Además, sería necesario estimar si la inyección intravenosa del radiofármaco por ejemplo a través de la vena de la cola del animal, mejoraría la especificidad de la señal reduciendo el fondo, ya que su distribución y lavado serían más rápidos. También será necesario testar otros radiofármacos utilizados para monitorizar el sistema dopaminérgico como ^{18}F -dopa (integridad de los terminales dopaminérgicos), ^{11}C -CFT y ^{11}C -RTI-32 (marcadores de DAT) u otras técnicas de imagen como SPECT para testar la presencia de DAT mediante ^{123}I - β -CIT, ^{123}I -FP-CIT, ^{123}I -altropan o $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -TRODAT-1 (Pavese and Brooks, 2009).

De estos estudios iniciales de PET podemos concluir que es posible realizar esta técnica de imagen en ratas hemiparkinsonianas. Es importante seguir con las investigaciones en esta área, ya que una vez puestas a punto, la combinación de las técnicas de imagen de IRM y PET nos permitirán realizar estudios longitudinales en un mismo animal y co-localizar un trasplante de células+NNP en un modelo vivo de Parkinson de roedor con la estructura anatómica del cerebro del animal y determinar si el trasplante está integrándose y compensando la pérdida de funcionalidad del estriado lesionado.

5. NUEVAS ACCIONES DE BCL-X_L.

Mediante los estudios de Q-RT-PCR realizados en las células hVM1 (a pase bajo) y hVM1 high Bcl-X_L añadimos algo de luz sobre el papel de Bcl-X_L en la génesis de neuronas dopaminérgicas. Su expresión forzada tiene efectos directos o indirectos sobre otros genes: retrasa la salida del ciclo celular de los precursores mesencefálicos (OTX2) y aumenta el número de progenitores neurales (SOX2) presentes en los cultivos. La interacción con estos genes permitiría que células de elevado pase (<20) recuperen el *pool* de progenitores neurales, volviendo a tener una alta capacidad neurogénica. Mediante la activación de genes pro-neurales (NEUROGENINA2), incrementaría el número de progenitores que optan por un fenotipo neuronal en lugar de glial. Posteriormente, mantendría elevados los valores de PITX3 durante el momento crucial para la expresión de TH. Esto, junto con una mayor expresión de otros factor de transcripción (NURR1) conllevaría a que a partir de las células que sobre-expresan Bcl-X_L un mayor número de progenitores neuronales tomaran un destino de diferenciación dopaminérgico y que, además, las neuronas dopaminérgicas generadas expresasen en mayor medida genes relacionados con su maduración y funcionalidad.

Este papel asociado a la promoción de neurogénesis aumentando el número de progenitores neuronales había sido anteriormente descrito por las Dras. Elisa García e Isabel Liste en nuestro laboratorio trabajando con otro modelo celular derivado de cerebro anterior (Liste et al., 2007). Estos estudios determinaron que la mayor cantidad de neuronas obtenida en cultivos que sobre-expresan Bcl-X_L se debía a un aumento del número de los progenitores neuronales y no a un favorecimiento de decisión de destino neuronal en lugar de glial. Esta función está muy alejada del papel clásico que se otorga a Bcl-X_L como miembro antiapoptótico de la familia de Bcl-2. Para tratar de descubrir las vías de actuación de Bcl-X_L en nuestro modelo (derivado de cerebro medio), optamos por realizar un ensayo de *microarrays* de ADN en el que pudiésemos descubrir nuevos genes que estén afectados por la expresión forzada de Bcl-X_L y que a su vez estuviesen relacionados con la pérdida/recuperación de la capacidad neurogénica con los pases. Así, identificamos una lista de genes de interés en la cual aquellos relacionados con el sistema dopaminérgico tenían un coeficiente de cambio catalogado como bajo. De esta forma, genes como OTX2, SOX2 y NEUROGENINA2 aunque están afectados por la expresión de Bcl-X_L, no parecen ser la causa directa de la pérdida de la capacidad neurogénica con los pases o puede que Bcl-X_L no actúe directamente sobre ellos, sino mediante otro gen intermediario que sí vea afectada en mayor medida su expresión. Tras seleccionar los genes con mayor índice de cambio, obtuvimos una lista de genes de interés en la que la mayor parte de ellos, aunque relacionados con el sistema nervioso, no tienen una

función clara descrita para el sistema dopaminérgico. Hasta ahora la proteína codificada por el gen Bcl-X_L se ha clasificado como antiapoptótica. Se localiza en la membrana externa de la mitocondria y mediante la regulación de los canales de membrana regula el potencial de membrana de la mitocondria, controlando la producción de especies reactivas del oxígeno y la liberación del citocromo c. También regula la traslocación de Bax a la mitocondria (ver apartado papel de Bcl-XL de la Introducción). Su acción sobre los genes descubiertos en este trabajo añadiría pruebas para ampliar el concepto clásico de función de Bcl-X_L.

Los genes alterados en nuestro estudio (ver sección 3 de resultados) están implicados en la regulación de la oxidación de monoaminas, receptores acoplados a proteínas G, receptores de membrana que activan canales iónicos, involucrados en el metabolismo del grupo hemo, proteínas de adhesión celular, control del ciclo celular y factores de transcripción. Algunos de estos genes están asociados al sistema nervioso, mientras que otros pertenecen a *locus* de función desconocida. Experimentos futuros abordarán el trabajo con estos genes de diversas maneras. Unos irán encaminados al bloqueo/estímulo de sus vías de actuación mediante una aproximación farmacológica (administración de drogas, inhibidores específicos), para determinar si su aplicación tiene algún efecto en la generación de neuronas dopaminérgicas a pase bajo-alto. Otros se basarán en estudios de sobre-expresión génica, para evaluar si alguno de estos genes o la combinación de varios repite los efectos de la expresión forzada de Bcl-X_L. De esta forma podríamos obtener resultados similares en recuperación de la capacidad neurogénica prescindiendo de Bcl-X_L, cuyo uso no pasaría al ámbito clínico debido a los procesos de transformación celular que podrían acompañar a su función antiapoptótica.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. La expansión prolongada *in vitro* de precursores neuronales humanos de mesencéfalo ventral es posible, aunque para ello se necesita su inmortalización y/o expresión forzada de Bcl-X_L. Las células mantienen la expresión de genes propios de la *floor plate* de mesencéfalo ventral, y diferencian como neuronas dopaminérgicas de la Sustancia Negra *pars compacta* (grupo A9), que son las indicadas para terapia de reemplazamiento celular en la enfermedad de Parkinson.
2. Las dos líneas celulares estudiadas conservan *in vitro* la expresión de genes importantes en la regionalización del cerebro medio durante el desarrollo del sistema nervioso (OTX2 y EN1), la aparición de los progenitores neuronales (SOX2, NEUROGENINA2, MASH1 y MSX1), la especificación dopaminérgica (LMX1b, NURR1, PITX3) y la generación de neuronas con el fenotipo dopaminérgico de tipo A9 (AADC, GTPCH, TH). Además, las células diferenciadas a largo plazo expresan las proteínas de unión a calcio, de maduración funcional de las neuronas dopaminérgicas (DAT, VMAT2, DRD2 Y GIRK2) y de receptores para otros neurotransmisores diferentes de la dopamina (GABA, Glu y acetilcolina) importantes en la regulación del sistema nigroestriatal y que deben estar presentes en una neurona dopaminérgica de tipo A9 funcional.
3. Bcl-X_L puede facilitar la generación de neuronas dopaminérgicas desde estos precursores al aumentar la expresión de OTX2 y NEUROGENINA2, posiblemente favoreciendo la generación de progenitores neuronales comprometidos a adquirir un fenotipo dopaminérgico. Durante la diferenciación, el fallo en la activación de PITX3 en hVM1, que no se produce en la línea hVM1 high Bcl-X_L, podría ser la causa de la menor expresión de genes relacionados con maduración funcional en estas células. Las neuronas dopaminérgicas de los cultivos de células hVM1 high Bcl-X_L tienen una mayor expresión de genes relacionados con maduración que las de hVM1 y aparecen antes durante la diferenciación de los cultivos en comparación con hVM1.
4. El patrón de distribución de neuritas en neuronas derivadas de las células hVM1 y hVM1 high Bcl-X_L es similar al de las células TH positivas derivadas de cultivos primarios de

mesencéfalo ventral, pero con una arborización menos compleja, y con una longitud total del árbol menor a 30d en el caso de hVM1 high Bcl-X_L. Además, este estudio revela un patrón de extensión/pérdida de prolongaciones particular para cada tipo celular según progresa la diferenciación.

5. Las neuronas dopaminérgicas derivadas de estos precursores mesencefálicos están equipadas con un transportador de dopamina funcional. Sabiendo que sintetizan y liberan dopamina, que expresan VMAT2 y DRD2 y que poseen un DAT funcional, se puede concluir que estas neuronas tienen las herramientas necesarias para ser funcionales.

6. Las neuronas generadas a partir de cultivos de hVM1 y hVM1 high Bcl-X_L poseen VOCCs, son excitables, y responden a neurotransmisores relacionados con la funcionalidad de neuronas A9 de Sustancia Negra *pars compacta* (GABA, glutamato y dopamina). Además, en los cultivos de hVM1 high Bcl-X_L se han encontrado oscilaciones de [Ca²⁺]_i dependientes de receptores de glutamato de tipo NMDA y de los receptores de dopamina.

7. Los cultivos de células hVM1 y hVM1 high Bcl-X_L diferenciados *in vitro* presentan propiedades electrofisiológicas típicas de fenotipos neuronales y gliales. La capacidad de generar potenciales de acción de larga duración (aunque inmaduros), la rectificación del potencial de membrana tras hiperpolarización, y el disparo de trenes de potenciales de acción, proporcionan la evidencia del potencial de los cultivos para alcanzar propiedades neuronales típicas de neuronas mesencefálicas.

8. Cuando se analiza molecularmente en detalle el papel de la expresión forzada de Bcl-X_L en estas células observamos que otros genes hasta ahora no relacionados directamente con neurogénesis y/o el sistema dopaminérgico ven alterada su expresión. Dichos genes serán objeto de estudios futuros ya que pueden ser responsables del mantenimiento de la capacidad neurogénica a pases elevados y la inducción específica del fenotipo dopaminérgico en las células. Su estudio es de gran interés con objeto expandir *in vitro* estos precursores neurales sin que se vean afectadas sus propiedades neurogénicas, evitando la sobre-expresión de un gen como Bcl-X_L.

9. Las hNSC pueden ser marcadas con NNP *in vitro* sin que se vean alteradas sus propiedades. Dicha marca puede ser detectada fácilmente mediante técnicas no invasivas (IRM) en ratas hemiparkinsonianas trasplantadas. Después de 5 meses de trasplante no todas

las NNP se encuentran en el interior de las células trasplantadas, por lo que la señal de IRM es adecuada a tiempos cortos para asegurarnos de la correcta localización del implante, pero a tiempos más largos no indica que la marca obtenida esté contenida en las células trasplantadas.

10. Mediante imagen de PET es posible estudiar la funcionalidad *in vivo* del sistema dopaminérgico. Sin embargo, serán necesarios futuros estudios con ^{11}C -DTBZ en animales trasplantados para averiguar por qué trasplantes con un fenotipo aparentemente inmaduro producen señal propia de neuronas dopaminérgicas maduras (VMAT2).

REFERENCIAS

REFERENCIAS

- Abeliovich, A. and Hammond, R.** (2007). Midbrain dopamine neuron differentiation: factors and fates. *Dev Biol* **304**, 447-54.
- Andersson, E., Tryggvason, U., Deng, Q., Friling, S., Alekseenko, Z., Robert, B., Perlmann, T. and Ericson, J.** (2006). Identification of intrinsic determinants of midbrain dopamine neurons. *Cell* **124**, 393-405.
- Andersson, E. K., Irvin, D. K., Ahlsio, J. and Parmar, M.** (2007). Ngn2 and Nurr1 act in synergy to induce midbrain dopaminergic neurons from expanded neural stem and progenitor cells. *Exp Cell Res* **313**, 1172-80.
- Anderton, B. H., Callahan, L., Coleman, P., Davies, P., Flood, D., Jicha, G. A., Ohm, T. and Weaver, C.** (1998). Dendritic changes in Alzheimer's disease and factors that may underlie these changes. *Prog Neurobiol* **55**, 595-609.
- Arbab, A. S., Bashaw, L. A., Miller, B. R., Jordan, E. K., Lewis, B. K., Kalish, H. and Frank, J. A.** (2003). Characterization of biophysical and metabolic properties of cells labeled with superparamagnetic iron oxide nanoparticles and transfection agent for cellular MR imaging. *Radiology* **229**, 838-46.
- Arbuthnott, G., Dunnett, S. and MacLeod, N.** (1985). Electrophysiological properties of single units in dopamine-rich mesencephalic transplants in rat brain. *Neurosci Lett* **57**, 205-10.
- Barberi, T., Klivenyi, P., Calingasan, N. Y., Lee, H., Kawamata, H., Loonam, K., Perrier, A. L., Bruses, J., Rubio, M. E., Topf, N. et al.** (2003). Neural subtype specification of fertilization and nuclear transfer embryonic stem cells and application in parkinsonian mice. *Nat Biotechnol* **21**, 1200-7.
- Benabid, A. L.** (2003). Deep brain stimulation for Parkinson's disease. *Curr Opin Neurobiol* **13**, 696-706.
- Berger, K., Przedborski, S. and Cadet, J. L.** (1991). Retrograde degeneration of nigrostriatal neurons induced by intrastriatal 6-hydroxydopamine injection in rats. *Brain Res Bull* **26**, 301-7.
- Bertrand, N., Castro, D. S. and Guillemot, F.** (2002). Proneural genes and the specification of neural cell types. *Nat Rev Neurosci* **3**, 517-30.
- Biederer, T. and Scheiffele, P.** (2007). Mixed-culture assays for analyzing neuronal synapse formation. *Nat Protoc* **2**, 670-6.
- Blakely, R. D. and DeFelice, L. J.** (2007). All aglow about presynaptic receptor regulation of neurotransmitter transporters. *Mol Pharmacol* **71**, 1206-8.
- Blakely, R. D., Defelice, L. J. and Galli, A.** (2005). Biogenic amine neurotransmitter transporters: just when you thought you knew them. *Physiology (Bethesda)* **20**, 225-31.
- Boise, L. H., Gonzalez-Garcia, M., Postema, C. E., Ding, L., Lindsten, T., Turka, L. A., Mao, X., Nunez, G. and Thompson, C. B.** (1993). bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell* **74**, 597-608.
- Brigit L. and Jochen R.** (2010). Ion channels and regulation of dopamine neuron activity. *Dopamine handbook* **3.4**, 118-137.
- Brundin, P., Karlsson, J., Emgard, M., Schierle, G. S., Hansson, O., Petersen, A. and Castilho, R. F.** (2000a). Improving the survival of grafted dopaminergic neurons: a review over current approaches. *Cell Transplant* **9**, 179-95.
- Brundin, P., Pogarell, O., Hagell, P., Piccini, P., Widner, H., Schrag, A., Kupsch, A., Crabb, L., Odin, P., Gustavii, B. et al.** (2000b). Bilateral caudate and putamen grafts of embryonic mesencephalic tissue treated with lazarooids in Parkinson's disease. *Brain* **123** (Pt 7), 1380-90.

- Brundin, P., Strecker, R. E., Lindvall, O., Isacson, O., Nilsson, O. G., Barbin, G., Prochiantz, A., Forni, C., Nieoullon, A., Widner, H. et al.** (1987). Intracerebral grafting of dopamine neurons. Experimental basis for clinical trials in patients with Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci* **495**, 473-96.
- Bulte, J. W., Arbab, A. S., Douglas, T. and Frank, J. A.** (2004). Preparation of magnetically labeled cells for cell tracking by magnetic resonance imaging. *Methods Enzymol* **386**, 275-99.
- Bulte, J. W. and Kraitichman, D. L.** (2004). Iron oxide MR contrast agents for molecular and cellular imaging. *NMR Biomed* **17**, 484-99.
- Burbach, J. P. and Smidt, M. P.** (2006). Molecular programming of stem cells into mesodiencephalic dopaminergic neurons. *Trends Neurosci* **29**, 601-3.
- Bustos, G., Abarca, J., Campusano, J., Bustos, V., Noriega, V. and Aliaga, E.** (2004). Functional interactions between somatodendritic dopamine release, glutamate receptors and brain-derived neurotrophic factor expression in mesencephalic structures of the brain. *Brain Res Brain Res Rev* **47**, 126-44.
- Bylund, M., Andersson, E., Novitch, B. G. and Muhr, J.** (2003). Vertebrate neurogenesis is counteracted by Sox1-3 activity. *Nat Neurosci* **6**, 1162-8.
- Cao, G., Pei, W., Ge, H., Liang, Q., Luo, Y., Sharp, F. R., Lu, A., Ran, R., Graham, S. H. and Chen, J.** (2002). In Vivo Delivery of a Bcl-xL Fusion Protein Containing the TAT Protein Transduction Domain Protects against Ischemic Brain Injury and Neuronal Apoptosis. *J Neurosci* **22**, 5423-31.
- Cohen, G. and Heikkila, R. E.** (1974). The generation of hydrogen peroxide, superoxide radical, and hydroxyl radical by 6-hydroxydopamine, dialuric acid, and related cytotoxic agents. *J Biol Chem* **249**, 2447-52.
- Collantes, M., Penuelas, I., Alvarez-Erviti, L., Blesa, J., Marti-Climent, J. M., Quincoces, G., Delgado, M., Ecay, M., Martinez, A., Arbizu, J. et al.** (2008). [Use of 11C-(+)-alpha -dihydrotetrabenazine for the assessment of dopaminergic innervation in animal models of Parkinson's disease]. *Rev Esp Med Nucl* **27**, 103-11.
- Cooper, O., Hargus, G., Deleidi, M., Blak, A., Osborn, T., Marlow, E., Lee, K., Levy, A., Perez-Torres, E., Yow, A. et al.** (2010). Differentiation of human ES and Parkinson's disease iPS cells into ventral midbrain dopaminergic neurons requires a high activity form of SHH, FGF8a and specific regionalization by retinoic acid. *Mol Cell Neurosci*.
- Courtois, E. T., Castillo, C. G., Seiz, E. G., Ramos, M., Bueno, C., Liste, I. and Martinez-Serrano, A.** (2010). In vitro and in vivo enhanced generation of human A9 dopamine neurons from neural stem cells by Bcl-XL. *J Biol Chem* **285**, 9881-97.
- Cowan, C. A., Klimanskaya, I., McMahon, J., Atienza, J., Witmyer, J., Zucker, J. P., Wang, S., Morton, C. C., McMahon, A. P., Powers, D. et al.** (2004). Derivation of embryonic stem-cell lines from human blastocysts. *N Engl J Med* **350**, 1353-6.
- Creese, I., Burt, D. R. and Snyder, S. H.** (1977). Dopamine receptor binding enhancement accompanies lesion-induced behavioral supersensitivity. *Science* **197**, 596-8.
- Cronberg, T., Rytter, A., Asztely, F., Soder, A. and Wieloch, T.** (2004). Glucose but not lactate in combination with acidosis aggravates ischemic neuronal death in vitro. *Stroke* **35**, 753-7.
- Chang, M. Y., Sun, W., Ochiai, W., Nakashima, K., Kim, S. Y., Park, C. H., Kang, J. S., Shim, J. W., Jo, A. Y., Kang, C. S. et al.** (2007). Bcl-XL/Bax proteins direct the fate of embryonic cortical precursor cells. *Mol Cell Biol* **27**, 4293-305.
- Chase, T. N. and Oh, J. D.** (2000). Striatal mechanisms and pathogenesis of parkinsonian signs and motor complications. *Ann Neurol* **47**, S122-9; discussion S129-30.
- Chen, Q. M., Liu, J. and Merrett, J. B.** (2000). Apoptosis or senescence-like growth arrest: influence of cell-cycle position, p53, p21 and bax in H2O2 response of normal human fibroblasts. *Biochem J* **347**, 543-51.

- Cherubini, E., Gaiarsa, J. L. and Ben-Ari, Y.** (1991). GABA: an excitatory transmitter in early postnatal life. *Trends Neurosci* **14**, 515-9.
- Cho, M. S., Hwang, D. Y. and Kim, D. W.** (2008). Efficient derivation of functional dopaminergic neurons from human embryonic stem cells on a large scale. *Nat Protoc* **3**, 1888-94.
- Cho, T., Bae, J. H., Choi, H. B., Kim, S. S., McLarnon, J. G., Suh-Kim, H., Kim, S. U. and Min, C. K.** (2002). Human neural stem cells: electrophysiological properties of voltage-gated ion channels. *Neuroreport* **13**, 1447-52.
- Christophersen, N. S., Meijer, X., Jorgensen, J. R., Englund, U., Gronborg, M., Seiger, A., Brundin, P. and Wahlberg, L. U.** (2006). Induction of dopaminergic neurons from growth factor expanded neural stem/progenitor cell cultures derived from human first trimester forebrain. *Brain Res Bull* **70**, 457-66.
- Chung, S., Hedlund, E., Hwang, M., Kim, D. W., Shin, B. S., Hwang, D. Y., Jung Kang, U., Isacson, O. and Kim, K. S.** (2005). The homeodomain transcription factor Pitx3 facilitates differentiation of mouse embryonic stem cells into AHD2-expressing dopaminergic neurons. *Mol Cell Neurosci* **28**, 241-52.
- Chung, S., Shin, B. S., Hwang, M., Lardaro, T., Kang, U. J., Isacson, O. and Kim, K. S.** (2006). Neural precursors derived from embryonic stem cells, but not those from fetal ventral mesencephalon, maintain the potential to differentiate into dopaminergic neurons after expansion in vitro. *Stem Cells* **24**, 1583-93.
- De Filippis, L., Lamorte, G., Snyder, E. Y., Malgaroli, A. and Vescovi, A. L.** (2007). A novel, immortal, and multipotent human neural stem cell line generating functional neurons and oligodendrocytes. *Stem Cells* **25**, 2312-21.
- de Rijk, M. C., Launer, L. J., Berger, K., Breteler, M. M., Dartigues, J. F., Baldereschi, M., Fratiglioni, L., Lobo, A., Martinez-Lage, J., Trenkwalder, C. et al.** (2000). Prevalence of Parkinson's disease in Europe: A collaborative study of population-based cohorts. Neurologic Diseases in the Elderly Research Group. *Neurology* **54**, S21-3.
- Dietz, G. P., Stockhausen, K. V., Dietz, B., Falkenburger, B. H., Valbuena, P., Opazo, F., Lingor, P., Meuer, K., Weishaupt, J. H., Schulz, J. B. et al.** (2008). Membrane-permeable Bcl-xL prevents MPTP-induced dopaminergic neuronal loss in the substantia nigra. *J Neurochem* **104**, 757-65.
- Donato, R., Miljan, E. A., Hines, S. J., Aouabdi, S., Pollock, K., Patel, S., Edwards, F. A. and Sinden, J. D.** (2007). Differential development of neuronal physiological responsiveness in two human neural stem cell lines. *BMC Neurosci* **8**, 36.
- Dunnett, S. B. and Bjorklund, A.** (1999). Prospects for new restorative and neuroprotective treatments in Parkinson's disease. *Nature* **399**, A32-9.
- Dunnett, S. and Bjorklund, A.** (2010). Transplantation of dopamine neurons: extent and mechanisms of functional recovery in rodent models of Parkinson's disease. Dopamine handbook, **9.4**, 454-477.
- Eom, D. S., Choi, W. S. and Oh, Y. J.** (2004). Bcl-2 enhances neurite extension via activation of c-Jun N-terminal kinase. *Biochem Biophys Res Commun* **314**, 377-81.
- Farlie, P. G., Dringen, R., Rees, S. M., Kannourakis, G. and Bernard, O.** (1995). bcl-2 transgene expression can protect neurons against developmental and induced cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 4397-401.
- Fisher, L. J., Young, S. J., Tepper, J. M., Groves, P. M. and Gage, F. H.** (1991). Electrophysiological characteristics of cells within mesencephalon suspension grafts. *Neuroscience* **40**, 109-22.
- Focke, A., Schwarz, S., Foerschler, A., Scheibe, J., Milosevic, J., Zimmer, C. and Schwarz, J.** (2008). Labeling of human neural precursor cells using ferromagnetic nanoparticles. *Magn Reson Med* **60**, 1321-8.
- Forsback, S., Niemi, R., Marjamaki, P., Eskola, O., Bergman, J., Gronroos, T., Haaparanta, M., Haapalinna, A., Rinne, J. and Solin, O.** (2004). Uptake of 6-[18F]fluoro-L-dopa

and [18F]CFT reflect nigral neuronal loss in a rat model of Parkinson's disease. *Synapse* **51**, 119-27.

Freed, C. R., Greene, P. E., Breeze, R. E., Tsai, W. Y., DuMouchel, W., Kao, R., Dillon, S., Winfield, H., Culver, S., Trojanowski, J. Q. et al. (2001). Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease. *N Engl J Med* **344**, 710-9.

Fu, L., Zhu, L., Huang, Y., Lee, T. D., Forman, S. J. and Shih, C. C. (2008). Derivation of neural stem cells from mesenchymal stemcells: evidence for a bipotential stem cell population. *Stem Cells Dev* **17**, 1109-21.

Gaffield, M. A. and Betz, W. J. (2006). Imaging synaptic vesicle exocytosis and endocytosis with FM dyes. *Nat Protoc* **1**, 2916-21.

Giros, B. and Caron, M. G. (1993). Molecular characterization of the dopamine transporter. *Trends Pharmacol Sci* **14**, 43-9.

Gonzalez-Garcia, M., Garcia, I., Ding, L., O'Shea, S., Boise, L. H., Thompson, C. B. and Nunez, G. (1995). bcl-x is expressed in embryonic and postnatal neural tissues and functions to prevent neuronal cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 4304-8.

Goridis, C. and Rohrer, H. (2002). Specification of catecholaminergic and serotonergic neurons. *Nat Rev Neurosci* **3**, 531-41.

Gulledge, A. T., Kampa, B. M. and Stuart, G. J. (2005). Synaptic integration in dendritic trees. *J Neurobiol* **64**, 75-90.

Guzman, R., Uchida, N., Bliss, T. M., He, D., Christopherson, K. K., Stellwagen, D., Capela, A., Greve, J., Malenka, R. C., Moseley, M. E. et al. (2007). Long-term monitoring of transplanted human neural stem cells in developmental and pathological contexts with MRI. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 10211-6.

Hagell, P. and Cenci, M. A. (2005). Dyskinesias and dopamine cell replacement in Parkinson's disease: a clinical perspective. *Brain Res Bull* **68**, 4-15.

Hansen, M. B., Nielsen, S. E. and Berg, K. (1989). Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J Immunol Methods* **119**, 203-10.

Haque, N. S., LeBlanc, C. J. and Isacson, O. (1997). Differential dissection of the rat E16 ventral mesencephalon and survival and reinnervation of the 6-OHDA-lesioned striatum by a subset of aldehyde dehydrogenase-positive TH neurons. *Cell Transplant* **6**, 239-48.

Harrison, P. J. (1999). The neuropathology of schizophrenia. A critical review of the data and their interpretation. *Brain* **122** (Pt 4), 593-624.

Hauser, R. A., Freeman, T. B., Snow, B. J., Nauert, M., Gauger, L., Kordower, J. H. and Olanow, C. W. (1999). Long-term evaluation of bilateral fetal nigral transplantation in Parkinson disease. *Arch Neurol* **56**, 179-87.

Heikkila, R. E. and Cohen, G. (1973). 6-Hydroxydopamine: evidence for superoxide radical as an oxidative intermediate. *Science* **181**, 456-7.

Hermann, A., Gastl, R., Liebau, S., Popa, M. O., Fiedler, J., Boehm, B. O., Maisel, M., Lerche, H., Schwarz, J., Brenner, R. et al. (2004). Efficient generation of neural stem cell-like cells from adult human bone marrow stromal cells. *J Cell Sci* **117**, 4411-22.

Hon, H., Rucker, E. B., 3rd, Hennighausen, L. and Jacob, J. (2004). bcl-xL is critical for dendritic cell survival in vivo. *J Immunol* **173**, 4425-32.

Horiguchi, S., Takahashi, J., Kishi, Y., Morizane, A., Okamoto, Y., Koyanagi, M., Tsuji, M., Tashiro, K., Honjo, T., Fujii, S. et al. (2004). Neural precursor cells derived from human embryonic brain retain regional specificity. *J Neurosci Res* **75**, 817-24.

Horn, A. S. (1990). Dopamine uptake: a review of progress in the last decade. *Prog Neurobiol* **34**, 387-400.

Huggett, J., Dheda, K., Bustin, S. and Zumla, A. (2005). Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes Immun* **6**, 279-84.

Iancu, R., Mohapel, P., Brundin, P. and Paul, G. (2005). Behavioral characterization of a unilateral 6-OHDA-lesion model of Parkinson's disease in mice. *Behav Brain Res* **162**, 1-10.

- Irizarry, R. A., Hobbs, B., Collin, F., Beazer-Barclay, Y. D., Antonellis, K. J., Scherf, U. and Speed, T. P.** (2003). Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics* **4**, 249-64.
- Jacobs, F. M., Smits, S. M., Noorlander, C. W., von Oerthel, L., van der Linden, A. J., Burbach, J. P. and Smidt, M. P.** (2007). Retinoic acid counteracts developmental defects in the substantia nigra caused by Pitx3 deficiency. *Development* **134**, 2673-84.
- Jacobs, F. M., van Erp, S., van der Linden, A. J., von Oerthel, L., Burbach, J. P. and Smidt, M. P.** (2009). Pitx3 potentiates Nurr1 in dopamine neuron terminal differentiation through release of SMRT-mediated repression. *Development* **136**, 531-40.
- Jensen, J. B. and Parmar, M.** (2006). Strengths and limitations of the neurosphere culture system. *Mol Neurobiol* **34**, 153-61.
- Jeon, B. S., Jackson-Lewis, V. and Burke, R. E.** (1995). 6-Hydroxydopamine lesion of the rat substantia nigra: time course and morphology of cell death. *Neurodegeneration* **4**, 131-7.
- Jin, H., Romano, G., Marshall, C., Donaldson, A. E., Suon, S. and Iacovitti, L.** (2006). Tyrosine hydroxylase gene regulation in human neuronal progenitor cells does not depend on Nurr1 as in the murine and rat systems. *J Cell Physiol* **207**, 49-57.
- Jordan, J., Galindo, M. F., Tornero, D., Gonzalez-Garcia, C. and Cena, V.** (2004). Bcl-x L blocks mitochondrial multiple conductance channel activation and inhibits 6-OHDA-induced death in SH-SY5Y cells. *J Neurochem* **89**, 124-33.
- Jorgensen, S., Nielsen, E. O., Peters, D. and Dyhring, T.** (2008). Validation of a fluorescence-based high-throughput assay for the measurement of neurotransmitter transporter uptake activity. *J Neurosci Methods* **169**, 168-76.
- Joseph, B., Wallen-Mackenzie, A., Benoit, G., Murata, T., Joodmardi, E., Okret, S. and Perlmann, T.** (2003). p57(Kip2) cooperates with Nurr1 in developing dopamine cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 15619-24.
- Jung, M., Kramer, E. M., Muller, T., Antonicek, H. and Trotter, J.** (1998). Novel pluripotential neural progenitor lines exhibiting rapid controlled differentiation to neurotransmitter receptor-expressing neurons and glia. *Eur J Neurosci* **10**, 3246-56.
- Kaufmann, W. E. and Moser, H. W.** (2000). Dendritic anomalies in disorders associated with mental retardation. *Cereb Cortex* **10**, 981-91.
- Kawasaki, H., Mizuseki, K., Nishikawa, S., Kaneko, S., Kuwana, Y., Nakanishi, S., Nishikawa, S. I. and Sasai, Y.** (2000). Induction of midbrain dopaminergic neurons from ES cells by stromal cell-derived inducing activity. *Neuron* **28**, 31-40.
- Kele, J., Simplicio, N., Ferri, A. L., Mira, H., Guillemot, F., Arenas, E. and Ang, S. L.** (2006). Neurogenin 2 is required for the development of ventral midbrain dopaminergic neurons. *Development* **133**, 495-505.
- Kim, D. W., Chung, S., Hwang, M., Ferree, A., Tsai, H. C., Park, J. J., Nam, T. S., Kang, U. J., Isacson, O. and Kim, K. S.** (2006). Stromal cell-derived inducing activity, Nurr1, and signaling molecules synergistically induce dopaminergic neurons from mouse embryonic stem cells. *Stem Cells* **24**, 557-67.
- Kim, H. J., Sugimori, M., Nakafuku, M. and Svendsen, C. N.** (2007). Control of neurogenesis and tyrosine hydroxylase expression in neural progenitor cells through bHLH proteins and Nurr1. *Exp Neurol* **203**, 394-405.
- Kim, J. H., Auerbach, J. M., Rodriguez-Gomez, J. A., Velasco, I., Gavin, D., Lumelsky, N., Lee, S. H., Nguyen, J., Sanchez-Pernaute, R., Bankiewicz, K. et al.** (2002). Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease. *Nature* **418**, 50-6.
- Kim, R.** (2005). Unknotting the roles of Bcl-2 and Bcl-xL in cell death. *Biochem Biophys Res Commun* **333**, 336-43.

- Kirik, D., Rosenblad, C. and Bjorklund, A.** (1998). Characterization of behavioral and neurodegenerative changes following partial lesions of the nigrostriatal dopamine system induced by intrastratial 6-hydroxydopamine in the rat. *Exp Neurol* **152**, 259-77.
- Ko, J. Y., Park, C. H., Koh, H. C., Cho, Y. H., Kyhm, J. H., Kim, Y. S., Lee, I., Lee, Y. S. and Lee, S. H.** (2007). Human embryonic stem cell-derived neural precursors as a continuous, stable, and on-demand source for human dopamine neurons. *J Neurochem* **103**, 1417-29.
- Korotkova, T. M., Ponomarenko, A. A., Brown, R. E. and Haas, H. L.** (2004). Functional diversity of ventral midbrain dopamine and GABAergic neurons. *Mol Neurobiol* **29**, 243-59.
- Krajewska, M., Mai, J. K., Zapata, J. M., Ashwell, K. W., Schendel, S. L., Reed, J. C. and Krajewski, S.** (2002). Dynamics of expression of apoptosis-regulatory proteins Bid, Bcl-2, Bcl-X, Bax and Bak during development of murine nervous system. *Cell Death Differ* **9**, 145-57.
- Kuroda, Y., Ichikawa, M., Muramoto, K., Kobayashi, K., Matsuda, Y., Ogura, A. and Kudo, Y.** (1992). Block of synapse formation between cerebral cortical neurons by a protein kinase inhibitor. *Neurosci Lett* **135**, 255-8.
- Lacey, M. G., Mercuri, N. B. and North, R. A.** (1989). Two cell types in rat substantia nigra zona compacta distinguished by membrane properties and the actions of dopamine and opioids. *J Neurosci* **9**, 1233-41.
- Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-5.
- Lang, A. E. and Lozano, A. M.** (1998). Parkinson's disease. First of two parts. *N Engl J Med* **339**, 1044-53.
- Lee, H. S., Bae, E. J., Yi, S. H., Shim, J. W., Jo, A. Y., Kang, J. S., Yoon, E. H., Rhee, Y. H., Park, C. H., Koh, H. C. et al.** (2010). Foxa2 and Nurr1 synergistically yield A9 nigral dopamine neurons exhibiting improved differentiation, function, and cell survival. *Stem Cells* **28**, 501-12.
- Lee, S. H., Lumelsky, N., Studer, L., Auerbach, J. M. and McKay, R. D.** (2000). Efficient generation of midbrain and hindbrain neurons from mouse embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* **18**, 675-9.
- Liste, I., Garcia-Garcia, E., Bueno, C. and Martinez-Serrano, A.** (2007). Bcl-XL modulates the differentiation of immortalized human neural stem cells. *Cell Death Differ* **14**, 1880-92.
- Liste, I., Garcia-Garcia, E. and Martinez-Serrano, A.** (2004). The generation of dopaminergic neurons by human neural stem cells is enhanced by Bcl-XL, both in vitro and in vivo. *J Neurosci* **24**, 10786-95.
- Livak, K. J. and Schmittgen, T. D.** (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**, 402-8.
- Lotharius, J., Barg, S., Wiekop, P., Lundberg, C., Raymon, H. K. and Brundin, P.** (2002). Effect of mutant alpha-synuclein on dopamine homeostasis in a new human mesencephalic cell line. *J Biol Chem* **277**, 38884-94.
- Maitra, A., Arking, D. E., Shivapurkar, N., Ikeda, M., Stastny, V., Kassaei, K., Sui, G., Cutler, D. J., Liu, Y., Brimble, S. N. et al.** (2005). Genomic alterations in cultured human embryonic stem cells. *Nat Genet* **37**, 1099-103.
- Manuel, M. and Price, D. J.** (2005). Role of Pax6 in forebrain regionalization. *Brain Res Bull* **66**, 387-93.
- Marek, K., Innis, R., van Dyck, C., Fussell, B., Early, M., Eberly, S., Oakes, D. and Seibyl, J.** (2001). [123I]beta-CIT SPECT imaging assessment of the rate of Parkinson's disease progression. *Neurology* **57**, 2089-94.
- Martin, W. R. and Wieler, M.** (2003). Treatment of Parkinson's disease. *Can J Neurol Sci* **30 Suppl 1**, S27-33.
- Martinat, C., Bacci, J. J., Leete, T., Kim, J., Vanti, W. B., Newman, A. H., Cha, J. H., Gether, U., Wang, H. and Abeliovich, A.** (2006). Cooperative transcription activation by Nurr1 and Pitx3 induces embryonic stem cell maturation to the midbrain dopamine neuron phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 2874-9.

- McRitchie, D. A., Hardman, C. D. and Halliday, G. M.** (1996). Cytoarchitectural distribution of calcium binding proteins in midbrain dopaminergic regions of rats and humans. *J Comp Neurol* **364**, 121-50.
- Meltzer, L. T., Christoffersen, C. L. and Serpa, K. A.** (1997). Modulation of dopamine neuronal activity by glutamate receptor subtypes. *Neurosci Biobehav Rev* **21**, 511-8.
- Mena-Segovia, J., Winn, P. and Bolam, J. P.** (2008). Cholinergic modulation of midbrain dopaminergic systems. *Brain Res Rev* **58**, 265-71.
- Mendez, I., Sanchez-Pernaute, R., Cooper, O., Vinuela, A., Ferrari, D., Bjorklund, L., Dagher, A. and Isacson, O.** (2005). Cell type analysis of functional fetal dopamine cell suspension transplants in the striatum and substantia nigra of patients with Parkinson's disease. *Brain* **128**, 1498-510.
- Mizuguchi, M., Sohma, O., Takashima, S., Ikeda, K., Yamada, M., Shiraiwa, N. and Ohta, S.** (1996). Immunochemical and immunohistochemical localization of Bcl-x protein in the rat central nervous system. *Brain Res* **712**, 281-6.
- Morrish, P. K., Rakshi, J. S., Bailey, D. L., Sawle, G. V. and Brooks, D. J.** (1998). Measuring the rate of progression and estimating the preclinical period of Parkinson's disease with [¹⁸F]dopa PET. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **64**, 314-9.
- Nelander, J., Hebsgaard, J. B. and Parmar, M.** (2009). Organization of the human embryonic ventral mesencephalon. *Gene Expr Patterns* **9**, 555-61.
- Neri, M., Maderna, C., Cavazzin, C., Deidda-Vigoriti, V., Politi, L. S., Scotti, G., Marzola, P., Sbarbati, A., Vescovi, A. L. and Gritti, A.** (2008). Efficient in vitro labeling of human neural precursor cells with superparamagnetic iron oxide particles: relevance for in vivo cell tracking. *Stem Cells* **26**, 505-16.
- Neuhoff, H., Neu, A., Liss, B. and Roeper, J.** (2002). I(h) channels contribute to the different functional properties of identified dopaminergic subpopulations in the midbrain. *J Neurosci* **22**, 1290-302.
- Nicoletti, I., Migliorati, G., Pagliacci, M. C., Grignani, F. and Riccardi, C.** (1991). A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods* **139**, 271-9.
- Nicholson, D. W.** (1999). Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ* **6**, 1028-42.
- Nicholson, D. W. and Thornberry, N. A.** (1997). Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci* **22**, 299-306.
- Offen, D., Beart, P. M., Cheung, N. S., Pascoe, C. J., Hochman, A., Gorodin, S., Melamed, E., Bernard, R. and Bernard, O.** (1998). Transgenic mice expressing human Bcl-2 in their neurons are resistant to 6-hydroxydopamine and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 5789-94.
- Olanow, C. W., Goetz, C. G., Kordower, J. H., Stoessl, A. J., Sossi, V., Brin, M. F., Shannon, K. M., Nauert, G. M., Perl, D. P., Godbold, J. et al.** (2003). A double-blind controlled trial of bilateral fetal nigral transplantation in Parkinson's disease. *Ann Neurol* **54**, 403-14.
- Olanow, C. W., Kordower, J. H. and Freeman, T. B.** (1996). Fetal nigral transplantation as a therapy for Parkinson's disease. *Trends Neurosci* **19**, 102-9.
- Oltvai, Z. N., Millman, C. L. and Korsmeyer, S. J.** (1993). Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* **74**, 609-19.
- Omodei, D., Acampora, D., Mancuso, P., Prakash, N., Di Giovannantonio, L. G., Wurst, W. and Simeone, A.** (2008). Anterior-posterior graded response to Otx2 controls proliferation and differentiation of dopaminergic progenitors in the ventral mesencephalon. *Development* **135**, 3459-70.
- Orme, R., Fricker-Gates, R. A. and Gates, M. A.** (2009). Ontogeny of substantia nigra dopamine neurons. *J Neural Transm Suppl*, 3-18.

- Ostenfeld, T., Joly, E., Tai, Y. T., Peters, A., Caldwell, M., Jauniaux, E. and Svendsen, C. N.** (2002). Regional specification of rodent and human neurospheres. *Brain Res Dev Brain Res* **134**, 43-55.
- Papanikolaou, T., Lenington, J. B., Betz, A., Figueiredo, C., Salamone, J. D. and Conover, J. C.** (2008). In vitro generation of dopaminergic neurons from adult subventricular zone neural progenitor cells. *Stem Cells Dev* **17**, 157-72.
- Parish, C. L., Castelo-Branco, G., Rawal, N., Tonnesen, J., Sorensen, A. T., Salto, C., Kokaia, M., Lindvall, O. and Arenas, E.** (2008). Wnt5a-treated midbrain neural stem cells improve dopamine cell replacement therapy in parkinsonian mice. *J Clin Invest* **118**, 149-60.
- Park, C. H., Kang, J. S., Kim, J. S., Chung, S., Koh, J. Y., Yoon, E. H., Jo, A. Y., Chang, M. Y., Koh, H. C., Hwang, S. et al.** (2006). Differential actions of the proneural genes encoding Mash1 and neurogenins in Nurr1-induced dopamine neuron differentiation. *J Cell Sci* **119**, 2310-20.
- Park, C. H., Minn, Y. K., Lee, J. Y., Choi, D. H., Chang, M. Y., Shim, J. W., Ko, J. Y., Koh, H. C., Kang, M. J., Kang, J. S. et al.** (2005). In vitro and in vivo analyses of human embryonic stem cell-derived dopamine neurons. *J Neurochem* **92**, 1265-76.
- Park, S., Lee, K. S., Lee, Y. J., Shin, H. A., Cho, H. Y., Wang, K. C., Kim, Y. S., Lee, H. T., Chung, K. S., Kim, E. Y. et al.** (2004). Generation of dopaminergic neurons in vitro from human embryonic stem cells treated with neurotrophic factors. *Neurosci Lett* **359**, 99-103.
- Paul, G., Christophersen, N. S., Raymon, H., Kiaer, C., Smith, R. and Brundin, P.** (2007). Tyrosine hydroxylase expression is unstable in a human immortalized mesencephalic cell line--studies in vitro and after intracerebral grafting in vivo. *Mol Cell Neurosci* **34**, 390-9.
- Pavese, N. and Brooks, D. J.** (2009). Imaging neurodegeneration in Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta* **1792**, 722-9.
- Perrier, A. L. and Studer, L.** (2003). Making and repairing the mammalian brain--in vitro production of dopaminergic neurons. *Semin Cell Dev Biol* **14**, 181-9.
- Perrone-Capano, C., Da Pozzo, P. and di Porzio, U.** (2000). Epigenetic cues in midbrain dopaminergic neuron development. *Neurosci Biobehav Rev* **24**, 119-24.
- Politis, M., Wu, K., Loane, C., Quinn, N. P., Brooks, D. J., Rehnrcrona, S., Bjorklund, A., Lindvall, O. and Piccini, P.** (2010). Serotonergic neurons mediate dyskinesia side effects in Parkinson's patients with neural transplants. *Sci Transl Med* **2**, 38ra46.
- Polster, B. M., Kinnally, K. W. and Fiskum, G.** (2001). BH3 death domain peptide induces cell type-selective mitochondrial outer membrane permeability. *J Biol Chem* **276**, 37887-94.
- Popko, J., Fernandes, A., Brites, D. and Lanier, L. M.** (2009). Automated analysis of NeuronJ tracing data. *Cytometry A* **75**, 371-6.
- Prakash, N. and Wurst, W.** (2006). Development of dopaminergic neurons in the mammalian brain. *Cell Mol Life Sci* **63**, 187-206.
- Prensa, L., Cossette, M. and Parent, A.** (2000). Dopaminergic innervation of human basal ganglia. *J Chem Neuroanat* **20**, 207-13.
- Puelles, E., Annino, A., Tuorto, F., Usiello, A., Acampora, D., Czerny, T., Brodski, C., Ang, S. L., Wurst, W. and Simeone, A.** (2004). Otx2 regulates the extent, identity and fate of neuronal progenitor domains in the ventral midbrain. *Development* **131**, 2037-48.
- Reiner, A., Yekutieli, D. and Benjamini, Y.** (2003). Identifying differentially expressed genes using false discovery rate controlling procedures. *Bioinformatics* **19**, 368-75.
- Richards, C. D., Shiroyama, T. and Kitai, S. T.** (1997). Electrophysiological and immunocytochemical characterization of GABA and dopamine neurons in the substantia nigra of the rat. *Neuroscience* **80**, 545-57.
- Rivera, C., Voipio, J., Payne, J. A., Ruusuvuori, E., Lahtinen, H., Lamsa, K., Pirvola, U., Saarma, M. and Kaila, K.** (1999). The K⁺/Cl⁻ co-transporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation. *Nature* **397**, 251-5.

- Rolletschek, A., Chang, H., Guan, K., Czyz, J., Meyer, M. and Wobus, A. M.** (2001). Differentiation of embryonic stem cell-derived dopaminergic neurons is enhanced by survival-promoting factors. *Mech Dev* **105**, 93-104.
- Roybon, L., Hjalt, T., Christophersen, N. S., Li, J. Y. and Brundin, P.** (2008). Effects on differentiation of embryonic ventral midbrain progenitors by Lmx1a, Msx1, Ng2, and Pitx3. *J Neurosci* **28**, 3644-56.
- Ruiz, F., Alvarez, G., Pereira, R., Hernandez, M., Villalba, M., Cruz, F., Cerdan, S., Bogonez, E. and Satrustegui, J.** (1998). Protection by pyruvate and malate against glutamate-mediated neurotoxicity. *Neuroreport* **9**, 1277-82.
- Sanchez-Pernaute, R., Ferree, A., Cooper, O., Yu, M., Brownell, A. L. and Isacson, O.** (2004). Selective COX-2 inhibition prevents progressive dopamine neuron degeneration in a rat model of Parkinson's disease. *J Neuroinflammation* **1**, 6.
- Sauer, H. and Oertel, W. H.** (1994). Progressive degeneration of nigrostriatal dopamine neurons following intrastriatal terminal lesions with 6-hydroxydopamine: a combined retrograde tracing and immunocytochemical study in the rat. *Neuroscience* **59**, 401-15.
- Sauer, H., Rosenblad, C. and Bjorklund, A.** (1995). Glial cell line-derived neurotrophic factor but not transforming growth factor beta 3 prevents delayed degeneration of nigral dopaminergic neurons following striatal 6-hydroxydopamine lesion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 8935-9.
- Savitt, J. M., Jang, S. S., Mu, W., Dawson, V. L. and Dawson, T. M.** (2005). Bcl-x is required for proper development of the mouse substantia nigra. *J Neurosci* **25**, 6721-8.
- Schmitt, E., Paquet, C., Beauchemin, M. and Bertrand, R.** (2007). DNA-damage response network at the crossroads of cell-cycle checkpoints, cellular senescence and apoptosis. *J Zhejiang Univ Sci B* **8**, 377-97.
- Schultzberg, M., Dunnett, S. B., Bjorklund, A., Stenevi, U., Hokfelt, T., Dockray, G. J. and Goldstein, M.** (1984). Dopamine and cholecystokinin immunoreactive neurons in mesencephalic grafts reinnervating the neostriatum: evidence for selective growth regulation. *Neuroscience* **12**, 17-32.
- Schwarz, S. C., Wittlinger, J., Schober, R., Storch, A. and Schwarz, J.** (2006). Transplantation of human neural precursor cells in the 6-OHDA lesioned rats: effect of immunosuppression with cyclosporine A. *Parkinsonism Relat Disord* **12**, 302-8.
- Sedlak, T. W., Oltvai, Z. N., Yang, E., Wang, K., Boise, L. H., Thompson, C. B. and Korsmeyer, S. J.** (1995). Multiple Bcl-2 family members demonstrate selective dimerizations with Bax. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 7834-8.
- Seo, S., Lim, J. W., Yellajoshyula, D., Chang, L. W. and Kroll, K. L.** (2007). Neurogenin and NeuroD direct transcriptional targets and their regulatory enhancers. *EMBO J* **26**, 5093-108.
- Shim, J. W., Park, C. H., Bae, Y. C., Bae, J. Y., Chung, S., Chang, M. Y., Koh, H. C., Lee, H. S., Hwang, S. J., Lee, K. H. et al.** (2007). Generation of functional dopamine neurons from neural precursor cells isolated from the subventricular zone and white matter of the adult rat brain using Nurr1 overexpression. *Stem Cells* **25**, 1252-62.
- Shtutman, M., Zhurinsky, J., Simcha, I., Albanese, C., D'Amico, M., Pestell, R. and Ben-Ze'ev, A.** (1999). The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 5522-7.
- Smidt, M. P. and Burbach, J. P.** (2007). How to make a mesodiencephalic dopaminergic neuron. *Nat Rev Neurosci* **8**, 21-32.
- Smith, A. D. and Bolam, J. P.** (1990). The neural network of the basal ganglia as revealed by the study of synaptic connections of identified neurones. *Trends Neurosci* **13**, 259-65.
- Smith, Y. and Kieval, J. Z.** (2000). Anatomy of the dopamine system in the basal ganglia. *Trends Neurosci* **23**, S28-33.

- Sonntag, K. C., Simantov, R., Kim, K. S. and Isacson, O.** (2004). Temporally induced Nurr1 can induce a non-neuronal dopaminergic cell type in embryonic stem cell differentiation. *Eur J Neurosci* **19**, 1141-52.
- Sorensen, A. T., Thompson, L., Kirik, D., Bjorklund, A., Lindvall, O. and Kokaia, M.** (2005). Functional properties and synaptic integration of genetically labelled dopaminergic neurons in intrastriatal grafts. *Eur J Neurosci* **21**, 2793-9.
- Sossi, V., Holden, J. E., Topping, G. J., Camborde, M. L., Kornelsen, R. A., McCormick, S. E., Greene, J., Studenov, A. R., Ruth, T. J. and Doudet, D. J.** (2007). In vivo measurement of density and affinity of the monoamine vesicular transporter in a unilateral 6-hydroxydopamine rat model of PD. *J Cereb Blood Flow Metab* **27**, 1407-15.
- Storch, A., Paul, G., Csete, M., Boehm, B. O., Carvey, P. M., Kupsch, A. and Schwarz, J.** (2001). Long-term proliferation and dopaminergic differentiation of human mesencephalic neural precursor cells. *Exp Neurol* **170**, 317-25.
- Studer, L., Csete, M., Lee, S. H., Kabbani, N., Walikonis, J., Wold, B. and McKay, R.** (2000). Enhanced proliferation, survival, and dopaminergic differentiation of CNS precursors in lowered oxygen. *J Neurosci* **20**, 7377-83.
- Summerfield, C., Junque, C., Tolosa, E., Salgado-Pineda, P., Gomez-Anson, B., Marti, M. J., Pastor, P., Ramirez-Ruiz, B. and Mercader, J.** (2005). Structural brain changes in Parkinson disease with dementia: a voxel-based morphometry study. *Arch Neurol* **62**, 281-5.
- Sun, R., Dittrich, J., Le-Huu, M., Mueller, M. M., Bedke, J., Kartenbeck, J., Lehmann, W. D., Krueger, R., Bock, M., Huss, R. et al.** (2005). Physical and biological characterization of superparamagnetic iron oxide- and ultrasmall superparamagnetic iron oxide-labeled cells: a comparison. *Invest Radiol* **40**, 504-13.
- Svendsen, C. N., Caldwell, M. A. and Ostenfeld, T.** (1999). Human neural stem cells: isolation, expansion and transplantation. *Brain Pathol* **9**, 499-513.
- Svendsen, C. N., Caldwell, M. A., Shen, J., ter Borg, M. G., Rosser, A. E., Tyers, P., Karmiol, S. and Dunnett, S. B.** (1997). Long-term survival of human central nervous system progenitor cells transplanted into a rat model of Parkinson's disease. *Exp Neurol* **148**, 135-46.
- Svendsen, C. N., Clarke, D. J., Rosser, A. E. and Dunnett, S. B.** (1996). Survival and differentiation of rat and human epidermal growth factor-responsive precursor cells following grafting into the lesioned adult central nervous system. *Exp Neurol* **137**, 376-88.
- Svendsen, C. N., ter Borg, M. G., Armstrong, R. J., Rosser, A. E., Chandran, S., Ostenfeld, T. and Caldwell, M. A.** (1998). A new method for the rapid and long term growth of human neural precursor cells. *J Neurosci Methods* **85**, 141-52.
- Takagi, Y., Takahashi, J., Saiki, H., Morizane, A., Hayashi, T., Kishi, Y., Fukuda, H., Okamoto, Y., Koyanagi, M., Ideguchi, M. et al.** (2005). Dopaminergic neurons generated from monkey embryonic stem cells function in a Parkinson primate model. *J Clin Invest* **115**, 102-9.
- Takahashi, K. and Yamanaka, S.** (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126**, 663-76.
- Tepper, J. M., Sawyer, S. F. and Groves, P. M.** (1987). Electrophysiologically identified nigral dopaminergic neurons intracellularly labeled with HRP: light-microscopic analysis. *J Neurosci* **7**, 2794-806.
- Thompson, L., Barraud, P., Andersson, E., Kirik, D. and Bjorklund, A.** (2005). Identification of dopaminergic neurons of nigral and ventral tegmental area subtypes in grafts of fetal ventral mesencephalon based on cell morphology, protein expression, and efferent projections. *J Neurosci* **25**, 6467-77.
- Tonnesen, J., Seiz, E. G., Ramos, M., Lindvall, O., Martinez-Serrano, A. and Kokaia, M.** (2010). Functional properties of the human ventral mesencephalic neural stem cell line hVM1. *Exp Neurol* **223**, 653-656.
- Topping, G. J., Dinelle, K., Kornelsen, R., McCormick, S., Holden, J. E. and Sossi, V.** (2010). Positron emission tomography kinetic modeling algorithms for small animal dopaminergic system imaging. *Synapse* **64**, 200-8.

- Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J.** (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 4350-4.
- Tsuneki, H., Klink, R., Lena, C., Korn, H. and Changeux, J. P.** (2000). Calcium mobilization elicited by two types of nicotinic acetylcholine receptors in mouse substantia nigra pars compacta. *Eur J Neurosci* **12**, 2475-85.
- Ungerstedt, U. and Arbuthnott, G. W.** (1970). Quantitative recording of rotational behavior in rats after 6-hydroxy-dopamine lesions of the nigrostriatal dopamine system. *Brain Res* **24**, 485-93.
- Vazin, T., Becker, K. G., Chen, J., Spivak, C. E., Lupica, C. R., Zhang, Y., Worden, L. and Freed, W. J.** (2009). A novel combination of factors, termed SPIE, which promotes dopaminergic neuron differentiation from human embryonic stem cells. *PLoS One* **4**, e6606.
- Vernay, B., Koch, M., Vaccarino, F., Briscoe, J., Simeone, A., Kageyama, R. and Ang, S. L.** (2005). Otx2 regulates subtype specification and neurogenesis in the midbrain. *J Neurosci* **25**, 4856-67.
- Vescovi, A. L., Parati, E. A., Gritti, A., Poulin, P., Ferrario, M., Wanke, E., Frolichsthal-Schoeller, P., Cova, L., Arcellana-Panlilio, M., Colombo, A. et al.** (1999). Isolation and cloning of multipotential stem cells from the embryonic human CNS and establishment of transplantable human neural stem cell lines by epigenetic stimulation. *Exp Neurol* **156**, 71-83.
- Villa, A., Liste, I., Courtois, E. T., Seiz, E. G., Ramos, M., Meyer, M., Juliusson, B., Kusk, P. and Martinez-Serrano, A.** (2009). Generation and properties of a new human ventral mesencephalic neural stem cell line. *Exp Cell Res* **315**, 1860-74.
- Villa, A., Snyder, E. Y., Vescovi, A. and Martinez-Serrano, A.** (2000). Establishment and properties of a growth factor-dependent, perpetual neural stem cell line from the human CNS. *Exp Neurol* **161**, 67-84.
- Waldvogel, H. J., Baer, K., Gai, W. P., Gilbert, R. T., Rees, M. I., Mohler, H. and Faull, R. L.** (2008). Differential localization of GABAA receptor subunits within the substantia nigra of the human brain: an immunohistochemical study. *J Comp Neurol* **506**, 912-29.
- Waldvogel, H. J., Billinton, A., White, J. H., Emson, P. C. and Faull, R. L.** (2004). Comparative cellular distribution of GABAA and GABAB receptors in the human basal ganglia: immunohistochemical colocalization of the alpha 1 subunit of the GABAA receptor, and the GABABR1 and GABABR2 receptor subunits. *J Comp Neurol* **470**, 339-56.
- Wegner, A. M., Nebhan, C. A., Hu, L., Majumdar, D., Meier, K. M., Weaver, A. M. and Webb, D. J.** (2008). N-wasp and the arp2/3 complex are critical regulators of actin in the development of dendritic spines and synapses. *J Biol Chem* **283**, 15912-20.
- Weiner, D. M., Levey, A. I. and Brann, M. R.** (1990). Expression of muscarinic acetylcholine and dopamine receptor mRNAs in rat basal ganglia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 7050-4.
- Weissleder, R., Stark, D. D., Engelstad, B. L., Bacon, B. R., Compton, C. C., White, D. L., Jacobs, P. and Lewis, J.** (1989). Superparamagnetic iron oxide: pharmacokinetics and toxicity. *AJR Am J Roentgenol* **152**, 167-73.
- Welstead, G. G., Brambrink, T. and Jaenisch, R.** (2008). Generating iPS cells from MEFS through forced expression of Sox-2, Oct-4, c-Myc, and Klf4. *J Vis Exp*.
- Wettenhall, J. M., Simpson, K. M., Satterley, K. and Smyth, G. K.** (2006). affyImGUI: a graphical user interface for linear modeling of single channel microarray data. *Bioinformatics* **22**, 897-9.
- Wilson, C. J. and Callaway, J. C.** (2000). Coupled oscillator model of the dopaminergic neuron of the substantia nigra. *J Neurophysiol* **83**, 3084-100.
- Wurst W. and Prakash N.** (2010). Genetic control of meso-diencephalic dopaminergic neuron development in rodents. *Dopamine handbook* **4.1**, 141-159.

- Yamazoe, H., Kobori, M., Murakami, Y., Yano, K., Satoh, M., Mizuseki, K., Sasai, Y. and Iwata, H.** (2006). One-step induction of neurons from mouse embryonic stem cells in serum-free media containing vitamin B12 and heparin. *Cell Transplant* **15**, 135-45.
- Yang, L., Matthews, R. T., Schulz, J. B., Klockgether, T., Liao, A. W., Martinou, J. C., Penney, J. B., Jr., Hyman, B. T. and Beal, M. F.** (1998). 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine neurotoxicity is attenuated in mice overexpressing Bcl-2. *J Neurosci* **18**, 8145-52.
- Yasumoto, F., Negishi, T., Ishii, Y., Kyuwa, S., Kuroda, Y. and Yoshikawa, Y.** (2004). Endogenous dopamine maintains synchronous oscillation of intracellular calcium in primary cultured-mouse midbrain neurons. *Cell Mol Neurobiol* **24**, 51-61.
- Yi, S. H., Jo, A. Y., Park, C. H., Koh, H. C., Park, R. H., Suh-Kim, H., Shin, I., Lee, Y. S., Kim, J. and Lee, S. H.** (2008). Mash1 and neurogenin 2 enhance survival and differentiation of neural precursor cells after transplantation to rat brains via distinct modes of action. *Mol Ther* **16**, 1873-82.
- Yuan, H., Sarre, S., Ebinger, G. and Michotte, Y.** (2005). Histological, behavioural and neurochemical evaluation of medial forebrain bundle and striatal 6-OHDA lesions as rat models of Parkinson's disease. *J Neurosci Methods* **144**, 35-45.
- Zamzami, N., Brenner, C., Marzo, I., Susin, S. A. and Kroemer, G.** (1998). Subcellular and submitochondrial mode of action of Bcl-2-like oncoproteins. *Oncogene* **16**, 2265-82.
- Zeng, X., Cai, J., Chen, J., Luo, Y., You, Z. B., Fotter, E., Wang, Y., Harvey, B., Miura, T., Backman, C. et al.** (2004). Dopaminergic differentiation of human embryonic stem cells. *Stem Cells* **22**, 925-40.
- Zetterstrom, T., Sharp, T., Marsden, C. A. and Ungerstedt, U.** (1983). In vivo measurement of dopamine and its metabolites by intracerebral dialysis: changes after d-amphetamine. *J Neurochem* **41**, 1769-73.
- Ziegler, M. G. and Szechtman, H.** (1990). Relation between motor asymmetry and direction of rotational behaviour under amphetamine and apomorphine in rats with unilateral degeneration of the nigrostriatal dopamine system. *Behav Brain Res* **39**, 123-33.
- Zinkel, S., Gross, A. and Yang, E.** (2006). BCL2 family in DNA damage and cell cycle control. *Cell Death Differ* **13**, 1351-9.